

Umweltforschungsplan des
Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit

Forschungskennzahl [3715373040]
UBA-FB-00 [trägt die UBA-Bibliothek ein]

Weiterentwicklung und Verbesserung des Konzeptes zur Begrenzung von Konservierungsmitteln für Produkte mit dem Blauen Engel

von

Viola Boenke, Ina Stephan, Sigrid Drecker
Bundeanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin

Bundeanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Unter den Eichen 87
12205 Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Abschlussdatum [April 2018]

Kurzbeschreibung

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde die biologische Prüfmethode der Checkliste zur stofflichen Bewertung im Rahmen des Aufnahmeverfahrens für weitere Topfkonservierungsmittel in den Anhang 1 zur Vergabegrundlage RAL-UZ102 „Emissionsarme Innenwandfarben“ überarbeitet. Der Test für den Einsatz von Konservierungsmitteln in seiner jetzigen Fassung besteht seit nahezu 20 Jahren und erfolgt ausschließlich an weißer Dispersionsfarbe für den Innenraum. Die hierbei ermittelten Höchstmengen für den Einsatz von Topfkonservierern werden z.Zt. auch auf andere Innenraumbauprodukte übertragen. Ziel war es zu klären, ob die Anforderungen an die Topfkonservierung bei Farben tatsächlich für andere Innenraumbauprodukte übernommen werden können. Die im Vorhaben durchgeführten Versuche deuten darauf hin, dass dies nicht ohne weiteres möglich ist. Nach Rücksprache mit Vertretern aus der Industrie wurde das Keimspektrum für die Prüfung zudem um Hefe- und Schimmelpilze erweitert. Des Weiteren wurde eine künstliche Alterung eingeführt und überprüft, ob dies einen Einfluss auf den Gehalt an Isothiazolinonen hat. Die Konzentration von Isothiazolinonen wurde mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie kontrolliert und hinsichtlich einer Korrelation mit dem Wachstum von Mikroorganismen ausgewertet. Da die in den Innenraumbauprodukten zugesetzten Isothiazolinone als Kontaktallergene bekannt sind, ist es ein Ziel des „Blauen Engel“-Umweltzeichens, die geringste erforderliche Menge an Konservierungsmittel in den Produkten zu verwenden, ohne die positive Auswirkung der Topfkonservierung zu gefährden. Daher sind die Optimierung der Leistungstärke von Konservierungsmitteln und die Kontrolle der Hygiene im Herstellungsprozess von zunehmender Bedeutung. Um Einblicke in den Herstellungsprozess von Farben zu gewinnen, wurden im Rahmen des Vorhabens vier Farbwerke besichtigt, in denen weiße Innenraumfarben produziert werden, die mit dem Umweltzeichen „Blauer Engel“ ausgezeichnet sind. Gemeinsam mit den Fachleuten vor Ort wurde diskutiert, welche Maßnahmen zur Verbesserung der Werkshygiene ergriffen werden können, um den Einsatz von Topfkonservierern möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurde in dem Forschungsvorhaben untersucht, ob eine schnellere Bestimmung der Keimzahl in den Rohstoffen mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion bereits im Farbwerk realisierbar ist.

Abstract

The major aim of the project was to revise i) the current test procedure for the determination of the concentration of preservative required for in-can protection of building products for indoor use and ii) the check list (according to annex 1 RAL-UZ102, "Low-emission wall paint") regarding the substance evaluation to allow the addition of new in-can preservatives. The current version has existed for nearly 20 years and while it only tests efficacy of a preservative in white dispersion paints, the results obtained are transferred to all other aqueous-based building products used indoors. This is then used to set the quantitative limits for the use of in-can preservative. One of the aims was therefore to clarify whether the requirements for the in-can-preservative of a white dispersion paint could be transferred to other aqueous-based, interior building products. The tests performed in the project suggest that this is not feasible. After consultation with representatives from industry, the spectrum of microorganisms used for testing was extended to include yeast and moulds. In addition, artificial aging was introduced, and it was checked whether this ageing had an impact on isothiazolinone-based preservatives. The concentration of isothiazolinone present was measured by means of UHPCL and evaluated with respect to a correlation with the growth of microorganisms. The isothiazolinone-based preservatives used in interior construction products are known to be contact allergens. Therefore, it is a goal of the "Blue Angel" to use the least amount of preservative required in a product without losing the positive effects of the active substance(s) used. Thus, the optimization of the performance of any preservatives used becomes ever more important and the control of hygiene in the manufacturing process will be critical. To gain an insight into the paint-making process four paint-producing plants where white interior paints are being produced and which have been awarded with the environmental label, "Blue Angel", were visited. Together with industry, it was discussed what measures can be taken to improve plant hygiene so as to minimise the use of in-can-preservatives as much as possible. Additionally, it

was investigated whether a faster determination of bacterial count in raw materials, by means of quantitative polymerase chain reaction, can be performed in the paint factory.

Danksagung

Die Autoren danken Ute Schoknecht*, Antje Bollwahn*, Helena Mathies*, Ines Wedell** und Thomas Sommerfeld*** für die analytische Bestimmung der Konservierungsmittel MIT und BIT.

Ein besonderer Dank geht an die Farb- und Klebstoffhersteller, die ihre Produkte für das Vorhaben zur Verfügung gestellt haben und eine Besichtigung der Produktion ermöglicht haben. Den Biozidherstellern danken wir für zusätzliche chemische Analysen. Allen beteiligten Experten danken wir für die stete Diskussionsbereitschaft.

*: BAM, Fachbereich 4.3

** : BAM, Fachbereich 4.1

***: BAM, Fachbereich 1.7

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	14
1 Zusammenfassung	15
1.1 Überarbeitung des Gebrauchstauglichkeitstests	15
1.1.1 Ergebnisse für weiße Wandfarben	16
1.1.2 Ergebnisse der Bodenbelagsklebstoffe	17
1.1.3 Bedeutung der künstlichen Alterung und Bestimmung des Konservierungsmittelgehalts	18
1.2 Bedeutung der Betriebshygiene	19
1.3 Alternativen der Konservierung	19
1.4 Schnellnachweis der Keimbelastung durch qPCR	20
1.5 Ausblick	20
2 Summary	21
2.1 Revision of the Biotest	21
2.1.1 Results for white interior paints	22
2.1.2 Results for adhesives	23
2.1.3 Importance of artificial ageing and determination of preservative content	23
2.2 Importance of industrial plant hygiene	24
2.3 Preservation alternatives	25
2.4 Detection of bacterial contamination by qPCR	25
2.5 Outlook	26
3 Einleitung	27
4 Material und Methoden	29
4.1 Innenraumbauprodukte	29
4.1.1 Dispersionsfarben	29
4.1.2 Dispersionsklebstoffe	30
4.2 Mikroorganismenstämme	30
4.3 Nährmedien	31
4.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl	31
4.5 Herstellung der Impfsuspension	31
4.5.1 Bakterien	31
4.5.2 Hefen	32
4.6 Herstellung der Sporensuspension	32

4.7	Bestimmung des MIT und BIT Gehalts.....	32
4.7.1	Dispersionsfarben	32
4.7.2	Dispersionsklebstoffe.....	33
4.8	Gebrauchstauglichkeitstest	33
4.9	Molekularbiologische Methoden.....	34
4.9.1	Präparation chromosomaler DNA.....	34
4.9.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
4.9.2.1	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	34
4.9.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	35
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Revision des Gebrauchstauglichkeitstests.....	35
5.1.1	Weiße Innenraumdispersionsfarbe mit Polyvinylacetat-Ethylen als Bindemittel	35
5.1.1.1	Bakterien	35
5.1.1.2	Hefen	38
5.1.1.3	Schimmelpilze	43
5.1.2	Weiße Innenraumdispersionsfarbe mit Reinacrylat als Bindemittel	45
5.1.2.1	Bakterien	45
5.1.2.2	Hefen	48
5.1.2.3	Schimmelpilze	51
5.1.2.4	Vergleich der Bindemittel	52
5.1.3	Weiße Innenraumdispersionsfarbe konserviert mit ZnP/BIT	53
5.1.3.1	Bakterien	54
5.1.4	Bodenbelagsklebstoffe.....	57
5.1.4.1	Bakterien	57
5.1.4.2	Hefen	60
5.1.4.3	Schimmelpilze	63
5.2	Klärung der Notwendigkeit und des Ziels einer chemischen Topfkonservierung unter Berücksichtigung der Betriebshygiene	65
5.3	Konservierung von Pigmentpasten.....	66
5.4	Erprobung von qPCR zur Quantifizierung von Bakterien in verschiedenen Substraten.....	67
5.4.1	Isolierung von DNA aus Dispersionsfarbe	68
5.4.2	Etablierung der qPCR für die Bakterien <i>P. aeruginosa</i> und <i>B. subtilis</i>	69
5.4.3	Isolierung von DNA aus Rohstoffen	71
6	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	74
6.1	Revision des Gebrauchstauglichkeitstests.....	74

6.2	Alternativer Schutz von wasserbasierten Innenraumfarben.....	76
6.3	Die qPCR zur Quantifizierung mikrobieller Verunreinigungen in Rohstoffen	78
6.4	Ausblick	78
7	Quellenverzeichnis.....	79
8	Anhang.....	80
8.1	Anlage 4a zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 "Emissionsarme Innenwandfarben"	80
8.2	Anlage 4b zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 "Emissionsarme Innenwandfarben"	83
8.3	Anlage 4c zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 "Emissionsarme Innenwandfarben"	87
8.4	Bestimmung der koloniebildenden Einheit in Dispersionsfarben	91
8.5	Bestimmung der koloniebildenden Einheit in Bodenbelagsklebstoffen	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung von Isothiazolinonen	27
Abbildung 2:	Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	33
Abbildung 3:	Belastungstest mit Bakterien in VA/E-haltiger Farbe	36
Abbildung 4:	Belastungstest mit Bakterien in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)	37
Abbildung 5:	Belastungstest mit Hefen in VA/E-haltiger Farbe	39
Abbildung 6:	Belastungstest Farbe 1 und Farbe 2 mit Hefen in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)	41
Abbildung 7:	Belastungstest Mischung 1 und Mischung 2 mit Hefen in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)	42
Abbildung 8:	Farbe 2 nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelsporen im Prüfgebilde (Öffnungsdurchmesser 62 mm)	43
Abbildung 9:	Belastungstest mit Bakterien in RA-haltiger Farbe.....	46
Abbildung 10:	Belastungstest mit Bakterien in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)	47
Abbildung 11:	Belastungstest mit Hefen in RA-haltiger Farbe	49
Abbildung 12:	Belastungstest mit Hefen in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)	50
Abbildung 13:	Vergleich der Bindemittel mit ungealterten und künstlich gealterten Farben (kA)	53
Abbildung 14:	Belastungstest mit Bakterien in SA-haltiger Farbe	55
Abbildung 15:	Belastungstest mit Bakterien in SA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)	56
Abbildung 16:	Belastungstest von Klebstoffen mit Bakterien	58
Abbildung 17:	Belastungstest von Klebstoffen mit Bakterien nach künstlicher Alterung (*)	59
Abbildung 18:	Belastungstest von Klebstoffen mit Hefen	61
Abbildung 19:	Belastungstest von Klebstoffen mit Hefen nach künstlicher Alterung (*).....	62
Abbildung 20:	Bandenmuster nach Amplifikation der 16S rRNA aus <i>P. aeruginosa</i> .	69
Abbildung 21:	Datenerhebung zur Bestimmung von DNA Mengen von <i>P. aeruginosa</i> durch qPCR	70
Abbildung 22:	Datenerhebung zur Bestimmung von DNA Mengen von <i>B. subtilis</i> durch qPCR	71
Abbildung 23:	Elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate von <i>B. subtilis</i> nach qPCR.....	71
Abbildung 24:	Isolierung von DNA verschiedener Verdünnungsstufen aus der angeimpften Reinacrylatdispersion 2	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Innenraumdispersionsfarben mit MIT/BIT – Konservierung	29
Tabelle 2:	Innenraumdispersionsfarbe mit ZnP/BIT - Konservierung	30
Tabelle 3:	Bakterienstämme	30
Tabelle 4:	Hefestämme	30
Tabelle 5:	Schimmelpilzstämme.....	31
Tabelle 6:	Acetonitril/Wassergradient	32
Tabelle 7:	Verwendete Oligonukleotide.....	34
Tabelle 8:	Verwendete Oligonukleotide qPCR	34
Tabelle 9:	Temperaturprofil qPCR.....	35
Tabelle 10:	MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	38
Tabelle 11:	BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	38
Tabelle 12:	MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Hefen ...	40
Tabelle 13:	BIT-Gehalt in VA/E-haltiger nach Belastungstest mit Hefen	40
Tabelle 14:	MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen	42
Tabelle 15:	BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen	43
Tabelle 16:	MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	44
Tabelle 17:	BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	44
Tabelle 18:	MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	44
Tabelle 19:	BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	45
Tabelle 20:	MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Bakterien.	46
Tabelle 21:	BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Bakterien ..	47
Tabelle 22:	MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	48
Tabelle 23:	BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	48
Tabelle 24:	MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Hefen.....	49
Tabelle 25:	BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Hefen.....	49
Tabelle 26:	MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen	51

Tabelle 27:	BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen	51
Tabelle 28:	MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	51
Tabelle 29:	BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	52
Tabelle 30:	MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	52
Tabelle 31:	BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	52
Tabelle 32:	BIT-Gehalt in SA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Bakterien ..	56
Tabelle 33:	BIT-Gehalt in SA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	57
Tabelle 34:	MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Bakterien	58
Tabelle 35:	BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Bakterien.....	59
Tabelle 36:	MIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	60
Tabelle 37:	BIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien.....	60
Tabelle 38:	MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen	61
Tabelle 39:	BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen	62
Tabelle 40:	MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen nach künstlicher Alterung	63
Tabelle 41:	BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen nach künstlicher Alterung	63
Tabelle 42:	MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	64
Tabelle 43:	BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	64
Tabelle 44:	MIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	64
Tabelle 45:	BIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen.....	65
Tabelle 46:	Eingesetzte Rohstoffe	72
Tabelle 47:	Bestimmung des DNA-Gehalts aus Rohstoffen	72
Tabelle 48:	qPCR mit isolierter DNA verschiedener Verdünnungsstufen aus künstlich beimpfter Reinacrylatdispersion 2	73
Tabelle 49:	Belastungstest Bakterien in VAE-haltiger Farbe	91
Tabelle 50:	Belastungstest Bakterien in VAE-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung	95

Tabelle 51:	Belastungstest Hefen in VAE-haltiger Farbe.....	99
Tabelle 52:	Belastungstest Hefen in VAE-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung	109
Tabelle 53:	Belastungstest Bakterien in RA-haltiger Farbe	117
Tabelle 54:	Belastungstest Bakterien in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung	120
Tabelle 55:	Belastungstest Hefen in RA-haltiger Farbe.....	122
Tabelle 56:	Belastungstest Hefen in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung	126
Tabelle 57:	Belastungstest Bakterien in SA-haltiger Farbe	129
Tabelle 58:	Belastungstest Bakterien in SA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung	132
Tabelle 59:	Belastungstest Bakterien in Bodenbelagsklebstoffen	138
Tabelle 60:	Belastungstest Bakterien in Bodenbelagsklebstoffen nach künstlicher Alterung	140
Tabelle 61:	Belastungstest Hefen in Bodenbelagsklebstoffen	143
Tabelle 62:	Belastungstest Hefen in Bodenbelagsklebstoffen nach künstlicher Alterung	146

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. faecalis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>A. sobria</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
BIT	Benzisothiazolinon
CIT	Chlormethylisothiazolinon
<i>C. boidinii</i>	<i>Candida boidinii</i>
<i>C. lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>C. valida</i>	<i>Candida valida</i>
DAD	Diodenarraydetektor
DBNPA	Dibromnitrilpropionamid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. candidum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
KBE	koloniebildende Einheit
MIT	Methylisothiazolinon
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Kartoffel-Glucose-Agar (Potato-dextrose-agar)
ppm	Parts per million
<i>P. ochrochloron</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. rettgeri</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>P. variotii</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RA	Reinacrylat
<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
rpm	rounds per minute
SA	Styrolacrylat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
VA/E	Vinylacetat/Ethylen
ZnP	Zinkpyrithion

1 Zusammenfassung

Ziel des Forschungsvorhabens war die Weiterentwicklung der Kriterien des Umweltzeichens „Blauer Engel“. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Überarbeitung der zurzeit gültigen Prüfmethode zur Gebrauchstauglichkeit von Topfkonservieren für Innenraumbauprodukte, die in wassergelöster Form angeboten werden. Es sollte zudem geklärt werden, ob die Anforderungen an die Topfkonservierung bei Farben für andere Innenraumbauprodukte übernommen werden können.

Das Umweltzeichen Blauer Engel besteht seit 40 Jahren und zeigt den Verbrauchern die ökologisch bessere Produktalternative auf. Durch den Blauen Engel werden Produkte ausgezeichnet, die schadstoffarm sind und die Innenraumluft so gering wie möglich belasten, wodurch potentielle Gesundheitsgefahren auf ein Minimum reduziert werden. Für Dispersionsfarben bedeutet dies, dass sie weder karzinogene noch erbgutverändernde, reproduktionstoxische und toxische Stoffe enthalten dürfen. Zudem sind Schwermetalle und Alkylphenoethoxylate sowie Weichmacher aus der Gruppe der Phthalate und der Organophosphate ausgeschlossen. Der Gehalt an leicht flüchtigen organischen Verbindungen ist auf 0,07 % begrenzt und der Gehalt an Formaldehyd darf 0,01 % nicht überschreiten. Aufgrund ihres Wassergehaltes und der Verwendung natürlicher Rohstoffe sind Dispersionsfarben jedoch anfällig für mikrobiellen Befall und müssen mit Konservierungsmitteln versetzt werden, um die Farben vor dem Abbau durch Mikroorganismen zu schützen und die Gebrauchsdauer des Produkts somit zu verlängern. Im Rahmen der Blauen Engel Zulassung dürfen nur Biozide eingesetzt werden, die im Anhang 1 der Vergabegrundlage RAL-UZ 102 als Topfkonservierer gelistet sind. Im Rahmen der Biozidprodukteverordnung (BPR, Anhang V) werden Biozide je nach Anwendung in 22 Produktarten (PT) eingestuft, die ihrerseits in vier Hauptgebiete zusammengefasst werden (Desinfektionsmittel, Schutzmittel, Schädlingsbekämpfungsmittel, sonstige Biozidprodukte). Topfkonservierungsmittel, wie sie bei Dispersionsfarben eingesetzt werden, fallen dabei unter PT6¹ und können nur in den Anhang 1 der Vergabegrundlage RAL-UZ 102 aufgenommen werden, wenn sie nach der Biozid-Verordnung verkehrsfähig sind. Bei Dispersionsfarben kommen als Konservierungsmittel vor allem Isothiazolinone zum Einsatz, die grundsätzlich kein Risiko für den Verbraucher darstellen. Problematisch sind diese Stoffe jedoch für Personen, die gegenüber Isothiazolinonen sensibilisiert sind. In diesem Fall kann der Aufenthalt in frisch gestrichenen Räumen zu allergischen Reaktionen der Haut führen. Daher müssen alle Produkte mit dem Blauen Engel seit dem Jahr 2000 entsprechend gekennzeichnet werden. Zudem wurden kostenfreie Allergiker-Hotlines eingerichtet, deren Telefonnummer sichtbar auf dem Produktgebilde angegeben werden muss.

1.1 Überarbeitung des Gebrauchstauglichkeitstests

Die Bestimmung der Wirkungsgrenze von Konservierungsmitteln bei Innenraumbauprodukten erfolgt im Rahmen der Blauen Engel Zulassung mittels eines Gebrauchstauglichkeitstests. Dieser Test besteht seit 1999 und wird ausschließlich bei weißer Wandfarbe angewendet und die Ergebnisse werden als maßgeblich für alle anderen Produkte betrachtet. Im Rahmen des Vorhabens wurde dieser biologische Test überarbeitet und überprüft, ob die für Innenfarben verwendeten Biozidkonzentrationen tatsächlich auf andere Innenraumbauprodukte übertragbar sind. Werksbegehungen und Diskussionen mit den Industrievertretern zeigten, dass viele verschiedene Rezepturen für weiße Wandfarben existieren. Für die Überarbeitung des biologischen Gebrauchstauglichkeitstests wurde handelsübliche weiße Innenraumdispersionsfarbe mit Polyvinylacetat als Bindemittel ausgewählt. Da in der Praxis auch häufig Kunstharzdispersionen verwendet werden, wurden die Versuche anschließend mit einer Farbe durchgeführt, in der Acrylharz als Bindemittel zum Einsatz kommt. Die Farben wurden aus der Industrie zur Verfügung gestellt und waren so angesetzt, dass sie sich nur in der Art des Bindemittels voneinander unterscheiden. Auf diese Weise konnte der Einfluss des Bindemittels auf die Durchführbarkeit und die

¹ PT6: Schutzmittel für Produkte während der Lagerung (Topfkonservierer): Produkte zum Schutz von Fertigerzeugnissen (außer Lebens- und Futtermitteln, kosmetischen Mitteln oder Arzneimitteln oder medizinischen Geräten) in Behältern gegen mikrobielle Schädigung zwecks Verlängerung ihrer Haltbarkeit; Produkte zum Schutz von Rodentizid-, Insektizid- oder anderen Ködern bei deren Lagerung oder Verwendung.

Resultate der entwickelten Testmethode untersucht werden. Die in seiner jetzigen Fassung vorliegende Prüfmethode untersucht ausschließlich weiße Wandfarben. Bei der Prüfung wird eine sehr hohe Keimbelastung bis zu 6x in die Farbe eingebracht (je 100-1000 Millionen Bakterien auf 50 g Farbe). Es ist zu bezweifeln, dass diese sehr hohe Keimbelastung in der Realität vor Abfüllung in das Gebinde vorliegt. Da Dispersionsfarben auch anfällig gegenüber Hefen und Schimmelpilzen sein können, wurden diese im revidierten Testverfahren ebenfalls berücksichtigt.

1.1.1 Ergebnisse für weiße Wandfarben

Die Versuche zeigten, dass lediglich bei den Farben, bei denen das Konservierungsmittel ausschließlich über das Bindemittel in das Produkt eingebracht wurde, ein Wachstum² von Hefen und Bakterien auftrat. Farben, die mit einer üblichen MIT/BIT Konservierung (jeweils 100 ppm) versehen waren, waren ausreichend gegenüber Mikroorganismen geschützt. Wurde die Konzentration an MIT und BIT halbiert, wurde bei den Hefen kein Wachstum nachgewiesen, jedoch wurde über den gesamten Versuchszeitraum die Ausbildung von Kolonien³ beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Versuchen mit Bakterien erhalten, wobei hier Kolonien nur bei der Farbe mit einem geringeren Bindemittelgehalt auftraten. Dies bedeutet, dass die reduzierte Konservierungsmittelkonzentration zwar ein Wachstum der Mikroorganismen verhindert, jedoch nur zu einer unvollständigen Abtötung der Bakterien und Hefen führt.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob es erforderlich ist, dass die eingesetzte Konzentration an Konservierungsmittel zu einer Sterilisierung des Produktes führen muss. Gespräche mit Vertretern der Industrie zeigten, dass ein Keimgehalt von bis zu 10² Keimen je Milliliter Farbe als akzeptabel angesehen wird. Dementsprechend könnte in einigen Fällen vermutlich eine produktabhängige Reduktion des Biozidgehalts vorgenommen werden. Es müsste jedoch sichergestellt werden, dass es zu keinem unkontrollierten Wachstum der Mikroorganismen und damit einhergehend zu einem Qualitätsverlust des Produktes kommt. Durch die Versuche wurde zudem deutlich, dass schon die Art des Bindemittels einen Einfluss auf die Anfälligkeit der Farbe gegenüber Mikroorganismen haben kann. Dispersionsfarbe mit Reinacrylat oder Vinylacetat/Ethylen als Bindemittel zeigte ein Wachstum von Bakterien bei der unkonservierten Farbe. Die Reduktion des Konservierungsmittelgehalts erlaubte jedoch nur bei Vinylacetat/Ethylen das Auftreten von Kolonien. Bei der Farbe mit Reinacrylat war weder ein bakterielles Wachstum noch die Ausbildung von Kolonien zu beobachten. Die Farbe schien in diesem Fall unter den Testbedingungen nicht durch Bakterien besiedelbar zu sein. Die Versuche mit Hefen zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen den Bindemitteln. Konnten die Hefen in einer unkonservierten Farbe mit Vinylacetat als Bindemittel wachsen, wurden bei einer Farbe mit Reinacrylat als Bindemittel lediglich Kolonien nachgewiesen.

Derzeitig ist die meist verwendete Wirkstoffkombination zur Konservierung von Dispersionswandfarben 100 ppm MIT + 100 ppm BIT. Beide Wirkstoffe sind nicht alleinig einsetzbar, da es Wirkungslücken gibt und somit ein ausreichender Schutz gegen mikrobiellen Befall nicht gegeben ist. Produkte mit einer MIT/BIT-Konservierung (jeweils ≤100 ppm) werden aufgrund der Neuregulierung des Wirkstoffs 2-Methyl-2(H)-isothiazol-3-on (MIT) in Zukunft mit einem Warnsymbol belegt sein; dies ist nicht mit dem Umweltzeichen Blauer Engel vereinbar. Es ist davon auszugehen, dass durch die maximal einsetzbare Konzentration auf ≤15 ppm (H317 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich) der Einsatz im Rahmen des Blauen Engels weiter beschränkt werden wird. Dem entgegen steht, dass eine Konservierung mit MIT nur zu erreichen ist, wenn mindestens 50 ppm MIT eingesetzt werden. Eine punktgenaue Konservierung ist aufgrund unterschiedlicher Stabilitäten in den verschiedenen Produkten nicht möglich. Daher wurde in Absprache mit der Industrie der Einsatz von Zinkpyrithion/BIT

² Im weiteren Text wird der Ausdruck „Wachstum“ gebraucht, wenn die Anzahl der auf dem Kulturmedium angezogenen Kolonien je Milliliter Farbe nach der Inkubation die Anzahl der zugefügten Keime je Milliliter vor der Inkubation übersteigt.

³ Im weiteren Text wird der Ausdruck „Ausbildung von Kolonien“ gebraucht, wenn die Anzahl der auf dem Kulturmedium angezogenen Kolonien je Milliliter Farbe nach der Inkubation geringer ist als die Anzahl der zugefügten Keime je Milliliter vor der Inkubation.

(≤ 100 ppm + 100 ppm) als Alternative zu BIT/MIT (≤ 100 ppm + ≤ 100 ppm) diskutiert und in ersten Versuchen getestet. Für diese Versuche wurde eine Dispersionsfarbe auf Acrylatbasis verwendet, die mit einer definierten Bakteriensuspension beimpft wurde. Wie in den vorherigen Untersuchungen zeigte sich, dass die Farbe mit dem höchsten Gehalt an Konservierungsmittel (100 ppm BIT und 100 ppm ZnP) am besten gegenüber Bakterien geschützt ist. Im Unterschied zu den bisherigen Ergebnissen wurde nach der künstlichen Alterung der Proben jedoch eine höhere Empfindlichkeit der Farben gegenüber Bakterien nachgewiesen. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass es schon innerhalb der Produktgruppe der Dispersionsfarben deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Mikroorganismen gibt.

In Abhängigkeit vom Bindemittel und des Konservierungsmittels wurden bei den Versuchen voneinander abweichende Ergebnisse erhalten, die darauf hindeuten, dass die Bedingungen für die Konservierung nicht einfach übertragen werden können.

Ausgehend von den Ergebnissen mit weißer Innenraumdispersionsfarbe wurden folgende Veränderungen bei der Durchführung des Testverfahrens eingeführt:

- Berücksichtigung einer künstlichen Alterung durch erhöhte Temperatur
- Herabsetzen der Inokulationszyklen von sechs auf drei unter Beibehaltung der sehr hohen Keimbelastung
- Einführen des Tests für Hefe- und Schimmelpilze, wobei diese getrennt voneinander betrachtet werden müssen, da es sich bei Schimmelpilzen um ein Oberflächenproblem handelt
- Quantitative Bestimmung der KBE/ml bei jedem Inokulationszyklus
- Einführen eines pass/fail Kriteriums und einer Validitätsprüfung

1.1.2 Ergebnisse der Bodenbelagsklebstoffe

Im Jahr 2016 wurden laut dem Marktforschungsinstitut Ceresana in Europa knapp 3,2 Millionen Tonnen Klebstoffe verbraucht. Bis zum Jahr 2024 wird ein Anstieg des Klebstoff-Umsatzes europaweit von 1,9 % pro Jahr erwartet (Marktstudie Klebstoffe-Europa, 3. Auflage März 2017). In den vergangenen Jahren wurde ein steigender Verbrauch von Dispersionsklebstoffen verzeichnet, im Jahr 2016 erreichten sie ca. 53 % des europäischen Gesamtumsatzes an Klebstoffen. In der Marktstudie von Ceresana wurden verschiedene Anwendungsbereiche untersucht. Es zeigte sich, dass das Segment Papier und Verpackungen mit 29 % des europäischen Verbrauchs den bedeutendsten Absatzmarkt für Klebstoffe im Jahr 2016 darstellte. An zweiter Stelle folgte die Bauindustrie.

Für die Untersuchungen der Bodenbelagsklebstoffe wurde ein Produkt mit einer MIT/BIT-Konservierung (jeweils 100 ppm) ausgewählt und hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Mikroorganismen getestet. Im Falle der Bakterien wurde nur bei der unkonservierten Probe ein Wachstum beobachtet. Die getesteten Klebstoffe mit einer MIT/BIT-Konservierung waren ausreichend gegenüber bakteriellem Befall geschützt; auch bei einer Reduktion des Konservierungsmittels um die Hälfte konnten keine Bakterien nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den künstlich gealterten Proben erhalten, wobei das Wachstum der Bakterien in den unkonservierten Proben etwas stärker ausfiel. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst in den Proben mit der verminderten Konservierungsmittelkonzentration ausreichend Biozid vorhanden war, um die Bakterien vollständig abzutöten. Im Falle der Hefen konnte weder in den ungealterten noch in den künstlich gealterten Klebstoffen ein Wachstum nachgewiesen werden. Bei den unkonservierten Proben wurde lediglich die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Bei allen anderen Proben wurden keine Hefen nachgewiesen. Das unterschiedliche Verhalten der getesteten Bodenbelagsklebstoffe verglichen mit den Farben unterstützt die Vermutung, dass die Bedingungen für die Konservierung nicht von einem Produkt auf das andere übertragbar sind.

1.1.3 Bedeutung der künstlichen Alterung und Bestimmung des Konservierungsmittelgehalts

In der revidierten Fassung des Gebrauchstauglichkeitstests wurde zudem eine künstliche Alterung der Proben aufgenommen, die vor Durchführung des Belastungstests mit Mikroorganismen erfolgt. Auf diese Weise lassen sich Aussagen bezüglich der Stabilität des Konservierungsmittels und der Empfindlichkeit der Produkte treffen. Bei allen Versuchen mit Dispersionsfarben und Bodenbelagsklebstoffen war ein Einfluss der künstlichen Alterung gegeben. Im Falle der MIT/BIT-konservierten Farben fiel das Wachstum bzw. das Auftreten von Kolonien deutlich geringer aus als bei den ungealterten Proben. Im Gegensatz dazu zeigten Farben mit einer ZnP/BIT-Konservierung sowie die Bodenbelagsklebstoffe nach der künstlichen Alterung eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Bakterien. Auch diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Bedingungen für die Konservierung nicht von einem Produkt auf ein anderes Produkt übertragen werden können.

Bei allen Versuchen wurde der Gehalt an Konservierungsmitteln vor und nach Ablauf der künstlichen Alterung und des mikrobiologischen Belastungstests durch Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) bestimmt. Durch die Benutzung eines Dioden-Array-Detektors zur Signalerfassung wurde der Gehalt an Bioziden sicher erfasst. Die analytische Erfassung des Zinkpyrithions (ZnP) ist verglichen mit der Bestimmung der anderen Biozide aufgrund der Reaktivität dieser Substanz aufwendiger und konnte im begrenzten finanziellen Rahmen des Vorhabens nicht zuverlässig durchgeführt werden. Hinsichtlich der Stabilität von MIT und BIT lassen sich folgende Aussagen treffen:

- eine Abnahme im Biozidgehalt erfolgte zum einen über die Zeit und zum anderen durch die Belastung mit Mikroorganismen
- MIT zeigte eine höhere Stabilität als BIT
- Bei MIT/BIT-konservierten Farben hatten die Bakterien keinen Einfluss auf den Konservierungsmittelgehalt. Kam es zu einer zeitlich bedingten Abnahme an MIT und BIT waren die Farben dennoch ausreichend gegenüber bakteriellem Befall geschützt (Farbe 3 und 4). Bei Dispersionsfarben, die mit ZnP und BIT konserviert waren, wurde nach der künstlichen Alterung eine Abnahme an BIT durch die bakterielle Belastung der Proben gemessen. Übereinstimmend damit wurden in diesen Proben Kolonien von Bakterien nachgewiesen.
- Die Belastung der Dispersionsfarben mit Hefen zeigte einen Einfluss auf den Konservierungsmittelgehalt. Nach Beendigung der Belastungstests wurde eine deutliche Abnahme in dem Gehalt an MIT und BIT gemessen. Auch wenn in diesen Proben zum Teil kein Wachstum stattgefunden hat, ist es durchaus denkbar, dass die überlebenden Hefen zu einem Konservierungsmittelabbau geführt haben. Lediglich die am stärksten konservierten Farben (100 ppm MIT und 100 ppm BIT) zeigten keine Abnahme im Biozidgehalt in Gegenwart von Hefen.
- Belastungstests mit Schimmelsporen zeigten nach der künstlichen Alterung eine Schimmelpilz-abhängige Abnahme des Konservierungsmittelgehalts in der bindemittelreichen Farbe (Vinylacetat/Ethylenbasis), bei der MIT und BIT ausschließlich über die Rohstoffe eingetragen wurden. Dies korreliert gut mit der Schimmelbildung an der Oberfläche dieser Dispersionsfarbe. Auch bei der Farbe mit einer verringerten Konservierungsmittelkonzentration und Reinacrylat als Bindemittel wurde eine Abnahme an MIT und BIT nachgewiesen.
- Bei den Bodenbelagsklebstoffen wurde keine Beeinflussung des Konservierungsmittelgehalts durch Mikroorganismen nachgewiesen. In allen Versuchen war die eingesetzte Konzentration an MIT und BIT ausreichend, um die Bakterien und Hefen vollständig abzutöten.

1.2 Bedeutung der Betriebshygiene

Das Wachstum von Mikroorganismen in den verschiedenen Produkten kann zu einer unerwünschten Veränderung der Produkteigenschaften (z.B. Viskosität, pH oder Geruch) führen. Neben dem Keimgehalt der Rohstoffe kommt dabei der Werkshygiene eine besondere Bedeutung bei der Keimbelastung der Produkte zu. Die bei der Abfüllung eingebrachten, stoffwechselaktiven Keime können nur durch eine entsprechende hohe Konzentration an Topfkonservierer an ihrer Vermehrung gehindert werden. Daher ist es wichtig, durch Maßnahmen der Betriebshygiene den Eintrag von Keimen in das Produkt frühestmöglich innerhalb des Produktionsprozesses zu limitieren. Gemeinsam mit der Industrie wurde diskutiert welche Möglichkeiten es gibt, den Biozidgehalt im Gebinde weiter zu reduzieren und zeitgleich eine sichere Lagerkonservierung zu gewährleisten.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden vier Farbwerke besichtigt, in denen weiße Wandfarbe produziert wird, die mit dem Blauen Engel ausgezeichnet ist. Bei allen Herstellern gab es Pläne zur regelmäßigen Prüfung der Werkshygiene. Werden im Laufe der Produktion erhöhte Keimzahlen nachgewiesen, werden bei den meisten Produzenten schnell abbaubare Biozide eingesetzt, die bei der Abfüllung des Produkts in das Gebinde bereits abgebaut sein sollten. Zum Schutz vor mikrobiellem Befall werden wässrig gelöste Rohstoffe und Zwischenprodukte mit Bioziden versehen, wobei diese bei der Berechnung des maximal möglichen Einsatzes an Biozid gemäß den Anforderungen der Vergabegrundlage des Blauen Engels berücksichtigt werden. Neben den Rohstoffen kommt auch dem Wasser eine bedeutende Rolle zu, welches zur Produktion eingesetzt wird. Beim Bau neuer Anlagen wurde bereits in den letzten Jahren auf eine möglichst gradlinige und verzweigungsfreie Zufuhr der Stoffe in der Produktion geachtet. Dennoch befinden sich in den Produktionsanlagen an vielen Stellen Toträume, in denen sich Rückstände bilden können, wodurch ein Keimwachstum begünstigt wird. Freie Leitungen werden mit sog. Molchen mechanisch gereinigt. Weitere Reinigungsschritte werden chemisch durchgeführt (z.B. H_2O_2).

Im Rahmen der Gespräche mit Industrievertretern wurde deutlich, dass von den Baumärkten eine Haltbarkeit von weißer Innenraumdispersionsfarbe in Gebinden von 2-3 Jahren gefordert wird und die Verbraucher eine Haltbarkeit von ca. 6 Monaten nach Öffnung des Gebindes und Gebrauch der Farbe erwarten. Es wurde diskutiert, ob Farben mit einem geringeren Konservierungsmittelgehalt mit einem Mindesthaltbarkeitsdatum versehen werden sollen und dem Verbraucher somit signalisiert werden kann, dass Farbe mit Blauer Engel Auszeichnung zeitnah verbraucht werden sollte. Farben, die für eine längere Lagerung von bis zu 2 Jahren vorgesehen sind, können weiterhin vermarktet werden, ohne das Umweltzeichen des Blauen Engels zu tragen. Dem Verbraucher muss durch Werbung etc. jedoch verständlich gemacht werden, dass frisch zu verbrauchende Farben weniger Biozide enthalten.

Eine weitere innerbetriebliche Maßnahme zur Reduktion von Topfkonservierern wäre die routinemäßige Anwendung von desinfizierend wirkenden Bioziden mit geringer Langlebigkeit im Gebinde. Hierdurch würde die Farbe keimfrei in das Gebinde gefüllt und der Bedarf an Topfkonservierer stark reduziert.

1.3 Alternativen der Konservierung

Isothiazolinone werden den Dispersionsfarben üblicherweise als Konservierungsmittel beigelegt und verlängern die Haltbarkeit der Produkte. Da sie jedoch zu den Kontaktallergenen gehören und bei sensibilisierten Personen zu allergischen Reaktionen führen können, ist die Nachfrage nach Alternativen gestiegen. Seit einigen Jahren werden konservierungsmittelfreie Wandfarben angeboten, die auch für Allergiker geeignet sind. Verglichen mit den konservierungsmittelhaltigen Produkten weisen sie eine um ca. 1/3 verringerte Lagerstabilität auf (raumkult24.de; 11.09.2017). Bei konservierungsmittelfreien Farben erfolgt der Schutz gegenüber mikrobiellem Befall durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 10,4 – 11,1. Bei Innenwand- und Fassadenfarben kommen bereits klassische Silikatfarben, Dispersionsilikatfarben und Sol-Silikatfarben mit einem erhöhten pH-Wert zum Einsatz. Durch die Erhöhung des pH-Wertes im alkalischen Bereich wird das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen behindert. Sporen können unter diesen Bedingungen jedoch überdauern.

Kommt es zu einem Abfall im pH-Wert bessern sich die Lebensbedingungen; die Sporen keimen aus und die Mikroorganismen können wachsen. Da einige Pigmente und Rohstoffe unter den erhöhten alkalischen Bedingungen jedoch nicht stabil sind, ist diese Art der Haltbarmachung nicht für alle Produkte gleichermaßen geeignet. Bei den Dispersionsfarben werden derzeit nur matte weiße Produkte angeboten. Glänzende und seidenglänzende sowie abgetönte Wandfarbe sind nach heutigem Stand (April 2018) technisch nicht möglich. Gleiches gilt auch für die Gruppe der Lacke.

1.4 Schnellnachweis der Keimbelastung durch qPCR

Um möglichst schnell eine Auskunft über die mikrobielle Belastung der Farbrohstoffe zu erhalten, wurde in diesem Forschungsvorhaben der Einsatz der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) als Alternative gegenüber der Bestimmung des Keimgehalts mit herkömmlichen Methoden untersucht. Die qPCR als Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren erlaubt eine Quantifizierung in Echtzeit. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt, wobei derjenige Zyklus der exponentiellen Phase genutzt wird, an dem das spezifische Produktsignal (C_T -Wert, engl. threshold cycle) erstmals das Hintergrundsignal überschreitet. Über eine Standardkurve mit bekannter DNA-Menge, kann die DNA-Menge einer unbekannt Probe ermittelt werden. Dabei werden die C_T -Werte der anfangs eingesetzten DNA-Menge gegen den Logarithmus aufgetragen. Aus dem C_T -Wert der unbekannt Probe kann dann auf die Templatmenge der Probe geschlossen werden. Diese Methode konnte in diesem Forschungsvorhaben erfolgreich für das Bakterium *P. aeruginosa* eingesetzt werden. Da ein mikrobieller Befall der Rohstoffe hauptsächlich durch Pseudomonaden stattfindet, wurde mit diesem Bakterium als typischen Vertreter gearbeitet. Mit isolierter DNA von *P. aeruginosa* wurde eine Standardkurve erstellt und es gelang, bekannte DNA-Mengen, die als Probe mitgeführt wurden, nachzuweisen. Allerdings gelang dies nur bei einer DNA-Extraktion, die aus einer wässrigen Zellsuspension erfolgte. Wurde dagegen der Rohstoff mit einer definierten Menge an Zellsuspension angeimpft und die DNA daraus anschließend isoliert, konnte nur ein Teil der DNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle wiedergefunden werden. Die Hauptschwierigkeit liegt damit in der absoluten Quantifizierung bei mikrobiell belasteten Rohstoffen. Die hohe Viskosität der Rohstoffe erschwert und behindert vermutlich die Isolierung der DNA-Menge.

1.5 Ausblick

Für Dispersionsfarben wurde ein neuer Gebrauchstauglichkeitstest entwickelt. Der neue Test ist aufwendig (getrennte Prüfung von Bakterien, Pilze und Hefen), er ermöglicht aber genauere Aussagen über Wirksamkeit der Konservierung und damit über die Stabilität der Farbe. Daneben gibt es in der Industrie eine stetige Weiterentwicklung von Dispersionsfarben, die nicht mit Bioziden haltbar gemacht werden. Diese neuen Dispersionsfarben haben in der Regel einen höheren pH-Wert unterhalb der Kennzeichnungsgrenze, der die Haltbarkeit der Farbe gewährleisten soll. Diese Entwicklung sollte im Hinblick auf den Blauen Engel weiter beobachtet werden.

Neben Dispersionsfarben müssen auch andere Bauprodukte konserviert werden wie beispielweise Lacke und Bodenbelagsklebstoffe. Der neu entwickelte Gebrauchstauglichkeitstest sollte grundsätzlich auch für diese Produkte geeignet sein, für die richtige Anwendung und die Bewertung der Ergebnisse besteht allerdings noch Forschungsbedarf. Für den qPCR-Test gab es verschiedene Überlegungen für sinnvolle Anwendungen im Rahmen der Betriebshygiene. Die Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass verlässliche Aussagen für Dispersionsfarben schwierig sind und eine Anwendung in der Praxis derzeit nicht absehbar ist.

2 Summary

The aim of the research project was the development of new criteria for the “Blue Angel” eco-label for water-based building products used indoors. Therefore, the currently valid test procedure for the determination of the concentration of preservative required for in-can preservation of building products for indoor use was revised. Clarification was also required as to whether the requirements for the in-can protection of white dispersion paints could be transferred to other interior building products.

The “Blue Angel” eco-label has existed for 40 years and identifies products to consumers that are more environmentally-friendly than other comparable, standard products. Products that have been awarded the “Blue Angel” are low-emission and the indoor air is affected as little as possible, thus minimising potential health risks. In the case of dispersion paints, no carcinogenic, mutagenic nor reprotoxic or toxic substances must be contained in the paints. No products containing plasticising substances based on phthalates or organophosphates or other comparable high-boiling point substances may be added to the low-emission wall paints. The content of volatile organic compounds of the wall paint must not exceed 0.07 % and the content of free-formaldehyde shall not exceed 0.01 % in the product.

The change from solvent-based products to water-based ones in many industries resulted in new challenges in terms of controlling microbial contamination and growth and prevent it from causing changes in the product properties (e.g. viscosity, color, pH). To protect the paints against these microbial attack biocides are added. White wall paints labelled with the “Blue Angel” shall contain only those substances as preservatives that are listed in annex 1 to the RAL-UZ 102 Basic criteria. The amounts indicated must not be exceeded and the preservation of the wall paint shall only be permitted during storage and transportation. In Annex V to the Biocidal Products Regulation (BPR), biocidal products are classified into 22 biocidal product-types (PT), grouped in four main areas (disinfectants, preservatives, pest control and other biocidal products). Preservatives that are used in wall paints are classified as PT6⁴ (preservatives for products during storage) and can only be included in Annex 1 of the RAL-UZ102 Basic criteria, if they are marketable according to the European Biocidal Regulation.

In interior wall paints isothiazolinone-based biocides are the most common and are effective in-can preservations agents. As these substances are known to be contact allergens that may cause contact dermatitis, they should be declared on the wall paint bucket of products bearing the eco-label. Additionally, allergic persons can make use of a personal advisory service.

2.1 Revision of the Biotest

The aim of the project was the revision of the current test procedure used to determine the concentration of preservative required for in-can building products for indoor use according to annex 5 RAL-UZ12a „Low-pollutant varnishes “. The test for the use of preservatives in its current version was developed in 1999 and is only based on efficacy tests in white dispersion paints. The results obtained are transferred to all other building products for indoor use. Therefore, it was verified as to whether the requirements for the in-can-preservation of a white dispersion paint could be transferred to other aqueous-based, interior building products. Visits to paint-producing plants and consultation with representatives from industry showed that many recipes for white wall paints exist. For the revision of the current test procedure, standard white interior paints containing a polyvinylacetate/ethylene binder were used. In parallel, experiments were performed using paints containing polymer dispersions based on pure acrylate as binder. The paints used were provided by industry and differed only in

⁴ PT6: Preservatives for products during storage: Used for the preservation of manufactures product, other than foodstuffs, feeding stuffs, cosmetics or medicinal products or medical devices by the control of microbial deterioration to ensure their shelf life. Used as preservatives for the storage or use of rodenticide, insecticide or other baits.

the type of binder. In this way the effect of the binder on the feasibility and the results of the revised test procedure could be studied. In the current test procedure, the interior paint is inoculated six times with a very high level of bacteria (100 -1000 million of bacteria in 50 g paints on each occasion). It is doubtful that such a high concentration of bacteria will be present before filling the paints into the containers and so this was considered to be an excessive challenge to employ. As white wall paints can also be sensitive to yeasts and moulds, these microorganisms have been considered in the revised test procedure also.

2.1.1 Results for white interior paints

The tests showed only growth⁵ of yeasts and bacteria in white interior paints in which the preservative was introduced exclusively by the binder. Paints with a usual MIT/BIT preservation (100 ppm each) were sufficiently protected against microbial attack. If the concentration of MIT and BIT was halved, no growth of yeasts was detected. In this case, only the formation of colonies⁶ was observed over the entire experimental period of six weeks. Similar results were obtained in the tests with bacteria, whereby colonies were only formed in the paint with a lower binder content. This means that the reduced preservative concentration prevents the growth of microorganisms, but only leads to incomplete inactivating of bacteria and yeasts.

This raises the question as to whether it is necessary that the preservative concentration employed should lead to the sterilisation of the product. Discussions with representatives from industry showed that a microbial content of up to 10^2 per milliliter paint is acceptable. Accordingly, in some cases, a product-dependent reduction of the biocidal content could probably be achieved. However, it must be ensured that there is no uncontrolled growth of the microorganisms resulting in a loss of quality of the product. The tests also showed that even the type of binder can influence the susceptibility of the paint to microorganisms. Only paints containing acrylate or vinylacetate/ethylene-based binders showed growth of bacteria when no preservative was added. Similarly, survival of microorganisms was only observed in paints containing vinylacetate/ethylene-based binders when the concentration of preservative used was reduced. Paints containing pure acrylate-based binders showed neither bacterial growth nor survival of the challenge organisms. Under the test conditions used the paint seems not to be susceptible to bacterial growth. Tests performed using yeasts showed also clear differences between the binders. The yeasts could only grow in the unpreserved paints containing vinylacetate/ethylene-based binders; in the presence of pure acrylate-binders only survival occurred, not growth.

Currently, the most common combination of active substances used for the preservation of white interior paints is 100 ppm MIT + 100 ppm BIT. Neither preservative can be used alone, as there are gaps in the efficacy spectrum that results in insufficient protection against microbial attack. Due to the new classification of MIT, products preserved with MIT/BIT (≤ 100 ppm each) will be marked with a warning symbol in future, which is not consistent with the ecolabel, "Blue Angel". It can be assumed, therefore, that the maximum usable concentration will be restricted to ≤ 15 ppm (H317: May cause an allergic skin reaction) by the Blue Angel approval process. As preservation with MIT can only be achieved at a concentration of at least 50 ppm it is unlikely to be used in Blue Angel compliant products.

After discussion with representatives from industry, zinc pyrithione/BIT was tested as an alternative preservative to MIT/BIT. For the tests, a white interior paint containing a styrene acrylate-based binder was used. As shown in the previous studies, the paint with the highest preservative concentration resulted in the best protection against bacteria. In contrast to the previous results, the paints were

⁵ In the following text the term "growth" is used if the number of colonies per milliliter of paint on agar plates after incubation exceeds the number of bacteria added per milliliter prior to incubation.

⁶ In the following text the term "formation of colonies" is used if the number of colonies per milliliter of paint on agar plates after incubation is less than the number of bacteria added per milliliter prior to incubation.

more susceptible to bacteria after artificial aging. These results also show that there are already differences in the susceptibility to microorganisms within the group of paints studied. Depending on the binder and the preservative, different results were obtained in the tests, which indicates that the conditions for preservation cannot simply be transferred from one product group to another.

Based on the results for white wall paints, several changes were introduced in the test procedure:

- Introduction of artificial ageing
- Reduction of the inoculum size and the number of inoculation cycles (from 6 to 3)
- Introduction of bacteria, yeasts and mould (additional tests separately with in-house microorganisms also possible)
- Quantitative determination of colony forming units (cfu)/ml after each inoculation cycle
- Documentation of biocidal content before and after artificial ageing and after the biotest by chemical analysis
- Introduction of a pass/fail criterium and validity check

2.1.2 Results for adhesives

According to the market research institute Ceresana, almost 3.2 million tons of adhesives were used in Europe in 2016. Adhesives sales are expected to increase by 1.9 % per year in Europe by 2024 (market study Adhesives-Europe, 3. Edition March 2017). In recent years, there has been an increase in the use of dispersion adhesives; in 2016, they accounted for approximately 53 % of total European sales of adhesives. The strongest demand was for vinyl-adhesives at 1.1 million tons. The Ceresana market study examined various areas of application. It turned out that the paper and packaging segment was the most important sales market for adhesives in 2016, accounting for 29% of use in Europe. The construction industry followed in second place.

For studying the susceptibility of floor-covering adhesives to microorganisms, a product containing MIT/BIT as a preservative (100 ppm each) was used. In the case of bacteria, growth was only detected in the unpreserved samples. Adhesives with standard MIT/BIT preservation were sufficiently protected against microbial contamination; even when the preservative content was reduced by half no bacteria could be detected. Similar results were obtained for the artificially aged samples, with slightly stronger growth of bacteria in the unpreserved samples occurring. The results show that even in the samples with a reduced preservative content sufficient biocide was present to completely kill the bacteria. In the case of yeasts, no growth was detected, either in the unaged or in the artificially aged samples. Survival of the challenge consortium was observed only in the unpreserved samples; in no other samples were yeasts detected. The different behavior of the floor-covering adhesives tested compared to the paints supports the assumption that the conditions for preservation cannot be transferred from one product to another.

2.1.3 Importance of artificial ageing and determination of preservative content

In the revised version of the biotest, the artificial aging of the samples prior to challenge testing was included. In this way, statements can be made regarding the stability of the preservative and the sensitivity of the products. In all tests performed with white wall paints and floor-covering adhesives an impact of the artificial aging was shown. In case of the MIT/BIT preserved paints, the growth or the survival of the challenge consortia was lower than in the unaged samples. In contrast, paints containing ZnP/BIT as a preserve and floor-covering adhesives were more susceptible to bacteria after the artificial ageing. These results also clearly show that the conditions for preservation cannot be transferred from one product to another.

In all tests, the concentration of preservatives present was determined both before and after artificial ageing and the after the biotest by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC), using a photo-diode-array detector. The analytical detection of zinc pyrithione (ZnP) is more complex compared to the determination of the other biocides due to the reactivity of this substance and could not be reliably performed within the limited financial framework of the project. Regarding the stability of MIT and BIT, the following statements can be made:

- A decrease in biocide concentration occurred both over time and due to the exposure to microorganisms
- MIT demonstrated higher stability than BIT
- In case of MIT / BIT-preserved paints, bacteria had no effect on the preservative concentration present. If there was a time-related decrease in MIT and BIT, the paints were nevertheless sufficiently protected against bacterial colonisation (color 3 and 4). For interior white paints preserved with ZnP and BIT, a decrease in the concentration of BIT after artificial aging was measured in the presence of bacteria. Consistent with this, bacteria were detected in these samples.
- In paints, yeasts had an influence on the concentration of preservative present. A significant decrease in MIT and BIT concentration was measured after the biotest. Even though growth could not be shown in all samples, it is quite possible that the surviving yeasts led to the degradation of preservatives. Only in case of the paints containing the highest concentration of MIT and BIT (100 ppm each) was no decrease in biocide concentration in the presence of yeasts detected.
- After artificial aging, tests with mould spores showed a mould-dependent decrease in the biocide concentration in the binder-rich paints (vinyl acetate/ethylene), in which MIT and BIT were introduced exclusively via the raw materials. This correlates well with the formation of mould on the surface of this paint that was (or is) observed in these products. A decrease in MIT and BIT concentration was also demonstrated in the paint containing a reduced preservative concentration and containing a pure acrylate-based binder.
- In the case of the floor-covering adhesives, no influence on the preservative concentration by microorganisms was detected. The concentration of MIT and BIT used was sufficient to completely kill the bacteria and yeasts in all experiments

2.2 Importance of industrial plant hygiene

The growth of microorganisms in various products can result in changes of properties of the product (e.g. viscosity, color, pH). In addition to the presence of microorganisms in raw-materials, the hygiene of industrial plant is an important source of the microbial load of a product. Metabolically active microorganisms, which are introduced in the products during filling, can only be prevented from multiplying by an effective concentration of in-can preservatives.

Therefore, it is important to limit the entry of germs in the product by industrial hygiene measures as soon as possible within the production process. Together with industry it was discussed what options there are to reduce the in-can biocide content and, at the same time, to ensure sufficient preservation during storage.

In the context of the research project, four paint factories were visited, which produced white wall paint and hold the German Blue Angel Environmental Label. All producers had schedules for regular check-ups on plant hygiene. If increased bacterial counts are detected during production, most producers use rapidly degradable biocides, which should already be degraded when the product is filled into the container.

To be protected against microbial infestation, aqueous dissolved raw materials and intermediates are provided with biocides, whereby these are taken into account when calculating the maximum possible use of biocides according to the Blue Angel requirements.

In addition to raw materials, water also plays an important role in production. During the construction of new plants, care has already been taken in recent years to ensure the straightest possible pipe work to supply e.g. raw materials in production. Nevertheless, in many places in the production facilities there are dead spaces in which residues can form, which promotes microbiological growth. Free pipes are mechanically cleaned with so-called pigs. Further cleaning steps are carried out chemically (e.g. H_2O_2).

During discussions with industry representatives it became clear that DIY stores demand a shelf life of white interior dispersion paint in containers of 2-3 years and consumers expect a shelf life of approx. 6 months after opening the container and using the paint. It was discussed whether paints with a lower preservative content should be provided with a minimum durability date and thus signaled to the consumer that paints with the Blue Angel label should be used up promptly. Paints intended for prolonged storage of up to 2 years could still be marketed without bearing the Blue Angel eco-label. However, in this case, the consumer would need to be made aware through advertising etc. that freshly used paints contain fewer biocides. Another in-house measure to reduce in-can preservatives would be the routine use of disinfectant biocides with low durability in the container. This would allow to fill the paint free of microorganisms into the container and greatly reduce the need for in-can preservatives.

2.3 Preservation alternatives

Isothiazolinone-based preservatives are often used in dispersion paints to ensure the shelf life of the products is sustained. Since they are known for to have allergenic potential, which can lead to allergic reactions in sensitized individuals, the demand for alternatives has increased. For some years now, preservative-free paints have been offered that are also suitable for individuals sensitive to certain preservatives. Compared to preservative-containing products they have a reduced shelf life by about 1/3 (raumkult24.de, 11.09.2017). Preservative-free paints are protected against microbial attack through increases in pH to 10,4 - 11,1. Classic silicate paints, dispersion silicate paints and sol-silicate paints with increased pH are already used for interior wall and facade paints. Increasing the pH into the alkaline range hinders the growth and proliferation of microorganisms. However, spores can survive under these conditions and adaptation may occur over time either in the product or in the production facility.

A decrease in the pH often leads to improved conditions of growth for many microorganisms; any spores present will germinate, and the microorganisms can then grow. However, as some pigments and raw materials are not stable under the increased alkaline conditions, this type of approach is not suitable for all products. At present, only matt white wall paints can be offered; high sheen, satin-gloss and tinted wall paints are not technically possible. The same applies to varnishes.

2.4 Detection of bacterial contamination by qPCR

In the research project it was investigated whether a faster determination of bacterial count in raw materials can be performed by means of quantitative polymerase chain reaction. Quantitative real-time PCR (qPCR), as an amplification method for nucleic acids, enables quantification in real time. Quantification is performed by fluorescence measurements during a PCR cycle, using the exponential phase of the cycle at which the specific product signal (Ct-value; threshold cycle) exceeds the background fluorescence for the first time. Via a standard curve created with a known quantity of DNA, the amount of DNA of an unknown sample can be determined. The Ct-value of the initial DNA quantity is plotted against the logarithm, allowing the determination of the template quantity of an unknown sample by using the corresponding Ct-value.

This method was successfully applied for the bacterium *P. aeruginosa*. This is a typical representative of problem organisms in paints industry as raw materials are mainly contaminated with pseudomonads. A standard curve was established with DNA isolated from *P. aeruginosa*. With this, samples with spiked amounts of DNA were measured and the amount of added DNA was verified. However, this was only successfully done, when the DNA was extracted from an aqueous cell solution. If, in contrast, a raw material was spiked with a known amount of DNA, it could only be partly recovered. However, when the raw material was spiked with a defined amount of a cell suspension and subsequently the DNA was isolated, the DNA could only be recovered partly in comparison to the control. It is likely that the high viscosity of a raw material hindered the isolation of DNA.

2.5 Outlook

In the research project new criteria for the “Blue Angel” eco-label for water-based building products used indoors were developed. The revised test is more complex (separate testing of bacteria, fungi and yeasts), but it allows more precise statements about the efficacy of the preservation and thus about the stability of the paint. Furthermore, there is a development in industry regarding dispersion paints that are not preserved with biocides. These new emulsion paints usually have a higher pH below the labeling limit to ensure the preservation of the paint. This development should continuously be observed with regard to the Blue Angel.

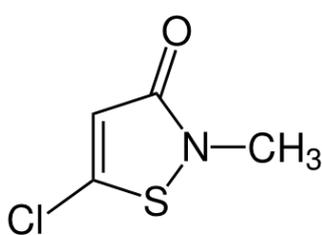
In addition to dispersion paints, other building products (e.g. varnishes and adhesives) must also be preserved. The revised biotest should in principle also be suitable for these products, but there is still a need for research for the correct application and evaluation of the results. For the qPCR test, there were various considerations for useful applications in the context of industrial plant hygiene. However, the research results show that reliable statements for dispersion paints are difficult and that an application in practice is currently not foreseeable.

3 Einleitung

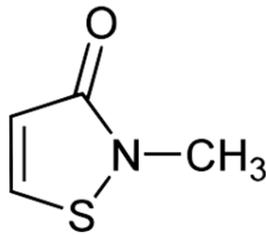
Mit der Umstellung von Lösemittel-basierten Innenraumbauprodukten auf wässrige Systeme kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Innenraumbelastung durch Lösungsmittel. Die heutzutage vermehrt eingesetzten Dispersionswandfarben bieten jedoch aufgrund ihres hohen Wassergehalts und der Verwendung natürlicher Rohstoffe die Voraussetzungen für das Wachstum von Mikroorganismen. Als Folge dessen kann es bei Farben zu Veränderungen der Produkteigenschaften, wie z.B. Viskositätsveränderungen, Geruchsbildung oder Farbänderungen, kommen. Daher werden gezielt Konservierungsmittel eingesetzt, um Dispersionsfarben vor dem Abbau durch stoffwechselaktive Mikroorganismen zu schützen. Problematisch erweist sich hierbei, dass die verwendeten Topfkonservierer in die Raumluft emittieren können (Plehn *et al.*, 2002.) und teilweise zu den Kontaktallergenen, wie z.B. Isothiazolinone, gehören. Daher wird angestrebt, den Gehalt an Topfkonservierern in wassergelösten Innenraumbauprodukten zu senken, ohne dabei die positive Auswirkung der Topfkonservierung zu gefährden.

Mit dem Umweltzeichen "Blauer Engel" werden emissions- und schadstoffarme Produkte ausgezeichnet, bei denen mögliche negative Auswirkungen auf Mensch und Umwelt auf ein Minimum reduziert sind. Bei Dispersionsfarben bedeutet dies konkret, dass sie besonders arm an Lösemitteln und Formaldehyd sind und der Anteil an Weichmachern unter 0,1% liegt. Darüber hinaus ist bei den Dispersionsfarben der Gehalt an Konservierungsmitteln begrenzt und durch die Vergabegrundlage RAL-UZ 102 streng geregelt, welche die zulässigen Konservierungsmittel und deren Kombinationen mit ihren Maximalgehalten auflistet (Anhang 1, RAL-UZ 102). Bei all den dort aufgeführten Wirkstoffen handelt es sich um Substanzen, die nach der Biozid-Verordnung EU NR. 528/2012 als verkehrsfähig eingestuft wurden. Dies bedeutet, dass der Wirkstoff in der jeweiligen Produktart bereits genehmigt wurde oder sich im Genehmigungsverfahren befindet. Auf der Liste befinden sich auch drei Vertreter aus der Gruppe der Isothiazolinone (Abbildung 1). Hierbei handelt es sich um heterozyklische Verbindungen, die neben Innenraumbauprodukten (z.B. Dispersionsfarben und Klebstoffe) auch in anderen Produkten, wie z.B. Kosmetika und Reinigungsmitteln, eine breite Anwendung als Topfkonservierungsmittel finden und die Produkte vor einer mikrobiellen Zersetzung schützen.

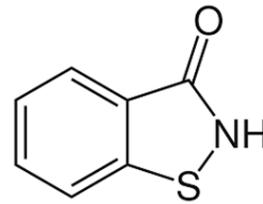
Abbildung 1: Darstellung von Isothiazolinonen



5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on
(CIT)



2-Methyl-2(H)-isothiazol-3-on
(MIT)



1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on
(BIT)

Aufgrund des hohen allergenen Potentials von CIT und durch die Begrenzung auf kleiner 15 ppm für Produkte mit dem Blauen Engel, stellte die Industrie von der Konservierungsmittelkombination CIT/MIT (Verhältnis 3:1) fast ausschließlich auf die Mischung MIT/BIT (Verhältnis 1:1) um. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass auch diese Kombination allergisierend wirken kann. Dies kann zum einen durch den direkten Kontakt mit wässrigen Formulierungen geschehen (Jayjock *et al.* 1996), zum anderen kann in frisch gestrichenen Räumen eine aerogene Kontaktdermatitis auftreten (Bohn *et al.*, 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Empfindlichkeit gegenüber Isothiazolinonen in Deutschland zwischen 2009 und 2012 stark zugenommen hat. Ursache hierfür scheint der Umstieg der Kosmetikindustrie von Parabenen auf Isothiazolinone als Konservierungsmittel (Uter *et al.*, 2013). Durch strengere gesetzliche Vorgaben wurde die erlaubte Menge an Isothiazolinonen in Kosmetikprodukten deutlich reduziert, was sich in einem Rückgang der Sensibilisierungsfälle seit 2014 widerspiegelt (Schnuch, 2016).

Im Rahmen des Forschungsvorhabens werden die Kriterien des bestehenden Belastungstests für die Ermittlung der maximal notwendigen Konzentration an Konservierungsmitteln überprüft. Hierzu wird der Verfahrensablauf, nach dem die Gebrauchstauglichkeit von Topfkonservierern in Innenraumfarben z.Zt. geprüft wird, überarbeitet. Die derzeitige Prüfmethodik besteht seit nahezu 20 Jahren und untersucht ausschließlich Wandfarben. Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Innenraumbauprodukten bezüglich der Anforderungen an die Topfkonservierung erfolgt bislang nicht. Der bestehende Test nach RAL-UZ 102, Annex 1 A, geht derzeit von einer sehr hohen Keimbelastung (100 - 1000 Millionen Bakterien auf 100 g Farbe) in dem abzufüllenden Produkt aus, deren Notwendigkeit im Rahmen der Überarbeitung des Verfahrens geprüft werden soll. Bei der Methode handelt es sich um einen wiederkehrenden Belastungstest, bei dem das Produkt sechsmalig mit dieser hohen Bakterienkonzentration beimpft wird. Der Biozideinsatz und die Prüfung dessen Wirksamkeit sind also auf eine extrem schlechte Ausgangssituation, die ggf. auch in der Werkshygiene begründet ist, ausgerichtet. Sollte im Herstellungsprozess solch eine hohe Keimzahl in Einzelfällen auftreten, so ist vor der Abfüllung in ein Gebinde eine Desinfektion erforderlich. Die zurzeit gültige Methode prüft somit, ob ein bestimmter Gehalt an Biozid diese Desinfektion bewirken kann. Es gilt aber zu beachten, dass nicht der Keimgehalt selbst ein Problem darstellt. Das Problem entsteht erst, wenn die Keime Stoffwechselaktivität zeigen und sich dadurch das Produkt verändert. Dauerstadien, wie z.B. Bacillus-Sporen, schädigen das Produkt im Gebinde nicht. Es sollte daher nachgewiesen werden, dass aktive Mikroorganismen das biozidarme Produkt bewachsen können. Hierdurch wird erst die Notwendigkeit eines Biozideinsatzes für die Topfkonservierung des Endproduktes gerechtfertigt und die Aktivität der im Test eingesetzten Mikroorganismen validiert. Die Herstellung eines biozidfreien Produkts ist jedoch nahezu unmöglich, da bereits manche Rohstoffe, insbesondere die Bindemitteldispersionen, zur Haltbarmachung Konservierungsmittel enthalten. Der Biozidgehalt der polymeren Dispersionen ist dabei nicht bekannt und kann in der Praxis im Farbwerk nur abgeschätzt werden. Aufgrund dieser Schätzung wird der Farbe im Produktionsverlauf eine weitere Menge an Biozid zugesetzt, um die Topfkonservierung während der Lagerdauer je nach Auslobung des Produkts zu gewährleisten. Die zulässigen Höchstwerte für Konservierungsmittel gemäß RAL-UZ 102 Anhang 1 gilt es dabei seitens des Farbherstellers einzuhalten. Im Rahmen der Überarbeitung der Prüfmethodik soll zudem die chemische Analyse des Biozidgehalts berücksichtigt werden, wodurch Rückschlüsse auf die Stabilität der Konservierungsmittel in den Dispersionsfarben über einen längeren Zeitraum möglich werden. Die meistens in den Farben enthaltenen Isothiazolinone lassen sich mit flüssigchromatographischen Methoden bestimmen, wohingegen die analytische Erfassung des Zinkpyrithions aufgrund dessen Reaktivität oftmals erschwert wird (Farbe und Lack, 2016). Des Weiteren soll in der revidierten Prüfanforderung eine künstliche Alterung an dem konservierten Produkt berücksichtigt werden.

Einen weiteren Schwerpunkt stellt in diesem Vorhaben die Betriebshygiene dar. Im Produktionsprozess gilt es, den Eintrag von Mikroorganismen in das Produkt möglichst früh durch entsprechende Maßnahmen zu limitieren. Die Keimbelastung der Produkte vor Abfüllung in das Gebinde ist dabei von verschiedenen Faktoren, wie dem Keimgehalt der Rohstoffe und der Werkshygiene, abhängig. Im Rahmen von Besichtigungen verschiedener Farbwerke wurde in Zusammenarbeit mit der entsprechenden Industrie nach praxisgerechten Ideen gesucht. Dieser Aspekt scheint aufgrund der aktuellen Diskussion über die Verwendung von Konservierungsmitteln in verbrauchernahen Produkten von besonderer Bedeutung. Im Verlauf des Vorhabens hat der Ausschuss für Risikobewertung (RAC) mit der Opinion vom März 2016 die Einführung eines spezifischen Konzentrationsgrenzwerts von 15 ppm für MIT vorgeschlagen. Sollte diese Einstufung erfolgen, müssen voraussichtlich ab 2019 Produkte mit MIT ab einer Konzentration von ≥ 15 ppm mit dem Gefahrenhinweis H317 (Kann allergische Hautreaktionen verursachen) gekennzeichnet werden. Es war davon auszugehen, dass die maximal einsetzbare Konzentration im Rahmen der Blauen Engel Zulassung auf < 15 ppm beschränkt werden müsste. Da MIT allein bei dieser Konzentration als Topfkonservierer nicht mehr wirksam ist, sind Alternativen zum Schutz der Produkte vor mikrobiellem Befall gefragt. Einige Möglichkeiten wurden im Rahmen des Vorhabens diskutiert und sind in dem Bericht aufgeführt. Die Jury Umweltzeichen hat auf der Dezembersitzung 2017 für Wandfarben beschlossen, keine neuen Zeichennutzungsverträge mehr für matte weiße Wandfarben abzuschließen, wenn diese Biozide (MIT und/oder CIT) zur Topfkonservierung enthalten. Bestehende Zeichennutzungsverträge und Anträge für seidenglänzende und pigmentierte Wandfarben sind hiervon nicht betroffen.

Diskussionen mit der Farbenindustrie zeigten zudem, dass eine Methodik zur schnellen Bestimmung von Keimgehalten in Rohstoffen und Produkt fehlt, die ermöglichen würde, Keimherde schneller zu identifizieren und ihnen entgegen zu wirken. Die frühe Erkennung eines Befalls durch Mikroorganismen würde den effizienten Einsatz kurzlebiger Biozide ermöglichen, wodurch das Ausbreiten der Keime im Werk und die Abfüllung kontaminierter Farbe in das Gebinde unterbunden würde. Ziel ist es daher im Rahmen des Forschungsvorhabens zu prüfen, ob die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) erlaubt, in relativ kurzer Zeit Auskunft über die Art und Quantität der Keime zu geben. Wäre dies möglich, könnten bereits innerhalb von wenigen Stunden Aussagen über den Keimgehalt gemacht werden und der Biozideinsatz somit effektiver gesteuert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Innenraumbauprodukte

4.1.1 Dispersionsfarben

Dispersionsfarben für den Innenraum basieren hauptsächlich auf drei Bindemittel-Klassen:

- Vinylacetat – Ethylen (VAE) – Copolymere
- Styrolacrylate (SA)
- Reinacrylate (RA)

VAE-Copolymere machen dabei den größten Anteil aus (Diedering und Dimmers, 2014). Für die Überarbeitung des Gebrauchstauglichkeitstests wurden weiße Innenraumdispersionsfarben verwendet, die von einem Farbhersteller zur Verfügung gestellt wurden. Die Farben variierten zum einen in der Art und dem Gehalt des Bindemittels, zum anderen in der Wahl des Konservierungsmittels. Eine Übersicht über die eingesetzten Farben ist in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Innenraumdispersionsfarben mit MIT/BIT – Konservierung

Biozid	Farbe 1	Farbe 2	Farbe 3	Farbe 4	Bindemittel
	8,8 % Dispersion	28,8 % Dispersion	8,8 % Dispersion	28,8 % Dispersion	VAE oder RA
MIT	nur aus ROH	nur aus ROH	+ 75 ppm	+ 75 ppm	100 ppm
BIT	nur aus ROH	nur aus ROH	+ 75 ppm	+ 75 ppm	100 ppm

ROH: Rohstoffe. Als Bindemittel wurde entweder Vinylacetat/Ethylen (VA/E) oder Reinacrylat (RA) eingesetzt.

Für die Versuche wurden zudem zwei Mischungen hergestellt, die eine reduzierte Biozidkonzentration aufwiesen: Mischung 1 wurde durch Mischen der Farbe 1 und Farbe 3 im Verhältnis 1:1 hergestellt, Mischung 2 durch Mischen der Farbe 2 und Farbe 4 im Verhältnis 1:1.

Des Weiteren wurde eine Dispersionsfarbe mit einer Konservierungsmittelkombination aus BIT und Zinkpyrithion und Styrolacrylat als Bindemittel verwendet (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Innenraumdispersionsfarbe mit ZnP/BIT - Konservierung

Biozid	Farbe 1*	Farbe 2	Farbe 3	Farbe 4	Bindemittel
	8,8 % Dispersion	8,8 % Dispersion	8,8 % Dispersion	8,8 % Dispersion	SA
BIT	nur aus ROH	+ 50 ppm	+ 100 ppm	+ 100 ppm	keine Angaben
ZnP	nur aus ROH	+ 50 ppm	+ 50 ppm	+ 100 ppm	keine Angaben

ROH: Rohstoffe, * Die unkonservierte Farbe wurde durch Zugabe von 15 ppm CIT und einer 20%igen Lösung aus DBNPA durch den Farbhersteller desinfiziert. Als Bindemittel wurde Styrolacrylat (SA) eingesetzt.

4.1.2 Dispersionsklebstoffe

Für die Durchführung des Gebrauchstauglichkeitstests wurde ein Dispersionsklebstoff konserviert mit MIT/BIT (100 ppm:100 ppm) von der Industrie zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um eine Formulierung einer wässrigen Dispersion eines Polymers auf Basis von Acrylsäureester, Acrylnitril und Harz. Als Kontrolle diente der unkonservierter Klebstoff. Für die Versuche wurden der konservierte und der unkonservierte Bodenbelagsklebstoff im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt.

4.2 Mikroorganismenstämme

Zur Überarbeitung des Gebrauchstauglichkeitstests wurden verschiedene Bakterien, Hefe – und Schimmelpilze in Abstimmung mit der betroffenen Industrie verwendet (siehe Tabellen 3-5).

Tabelle 3: Bakterienstämme

Stamm	Stammnummer
<i>Aeromonas sobria</i>	BAM 485
<i>Alcaligenes faecalis</i>	BAM 604, DSM 6174, ATCC 35655
<i>Escherichia coli</i> *	BAM 605, DSM 787, ATCC 11229
<i>Providencia rettgeri</i>	BAM 488, NCIMB 10842
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BAM 489, DSM 939, ATCC 15442
<i>Pseudomonas putida</i>	BAM 644, DSM 291 ^T , ATCC 12633
<i>Pseudomonas stutzeri</i> *	BAM 607, DSM 5190 ^T , ATCC 17588
<i>Serratia marcescens</i>	BAM 491

*: Risikogruppe 1, alle anderen gelisteten Bakterien gehören zur Risikogruppe 2.

Der Stamm *A. hydrophila* wurde nach Erfassung neuer Daten in *Aeromonas sobria* umbenannt.

Tabelle 4: Hefestämme

Stamm	Stammnummer
<i>Candida boidinii</i>	BAM 649
<i>Yarrowia lipolytica</i>	BAM 641, BIO 11-0335
<i>Candida valida</i>	BAM 643
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BAM 28, IMI 358541
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BAM 128, DSM 13622, IMI 358542

Tabelle 5: Schimmelpilzstämme

Stamm	Stammnummer
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAM 613, NBRC 100959
<i>Geotrichum candidum</i>	BAM 639, DSM 13629, IMI 359544
<i>Paecilomyces variotii</i> *	BAM 19, DSM 1961, ATCC 18502
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	BAM 25, DSM 1945

*: Risikogruppe 2, alle anderen gelisteten Pilze gehören zur Risikogruppe 1.

4.3 Nährmedien

Für die Versuche mit Bakterien wurde CASO-Medium verwendet. Dieses setzte sich aus 1,5 % Pepton aus Casein, 1,5 % Pepton aus Soja, 0,5 % Natriumchlorid und 1,5 % Agar zusammen. Der pH lag bei $7,3 \pm 0,2$. Die Versuche mit Hefe- und Schimmelpilzen wurden mit PDA-Medium durchgeführt. Dieses Medium setzte sich aus 0,4 % Kartoffel-Infus, 2 % Glucose und 1,5 % Agar zusammen. Der pH lag bei $5,6 \pm 0,2$. Um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien zu unterdrücken, wurde dem PDA-Nährmedium Chloramphenicol in einer finalen Konzentration von 30 µg/ml zugegeben.

4.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Für die mikroskopische Zählung von Bakterien wurde eine Thoma - Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,02 mm verwendet, für die Zählung von Hefen und Pilzsporen eine Thoma - Kammer mit einer Tiefe von 0,1 mm.

Die Zellzahl pro ml unverdünnter Mikroorganismensuspension berechnet sich nach folgender Formel:

Bakterien:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\sum \text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 2 * 10^7}{\sum \text{ausgezählten Kleinquadrate}}$$

Hefe- und Schimmelpilze:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\sum \text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 4 * 10^6}{\text{Zahl der ausgezählten Kleinquadrate}}$$

4.5 Herstellung der Impfsuspension

4.5.1 Bakterien

Zur Herstellung von Impfsuspensionen wurden die Bakterien von einer Dauerkultur (Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei $30 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur), für weitere 18 - 24 Stunden bei $30 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ inkubiert und für die Herstellung der Impfsuspension verwendet. Von jedem Bakterienstamm wurden getrennte Suspensionen hergestellt, indem die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung (physiologische Kochsalzlösung) benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen wurde. Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wurde mittels einer Thoma-Zählkammer ermittelt (siehe 4.4). Zur Herstellung der Mischsuspension wurden die einzelnen Bakterien suspensionen gemischt und auf eine finale Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ KBE/ml eingestellt. Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wurde durch ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe kontrolliert.

4.5.2 Hefen

Zur Herstellung von Impfsuspensionen wurden die Hefen von einer Dauerkultur (Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Hefen von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur), für 18 - 24 h bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ inkubiert und für die Herstellung der Impfsuspension verwendet. Von jedem Hefestamm wurden getrennte Suspensionen hergestellt, indem die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung (physiologische Kochsalzlösung) benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen wurde. Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wurde mittels einer Thoma-Zählkammer ermittelt (siehe 4.4). Zur Herstellung der Mischsuspension wurden die einzelnen Hefesuspensionen gemischt und auf eine finale Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml eingestellt. Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wurde durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe kontrolliert.

4.6 Herstellung der Sporensuspension

Zur Herstellung der Sporensuspension wurden die Schimmelpilze ca. 14 Tage vor Ansatz des Gebrauchtauglichkeitstests auf Nähragarplatten überimpft. Unter sterilen Bedingungen wurden Reagenzgläser mit 10 ml Benetzungsmittel-Lösung (Tween 80) gefüllt und ein Wattestab mit dieser Lösung befeuchtet. Das Sporenmateriale wurde anschließend mit dem Wattestab von der Nähragarplatte abgestrichen und durch Reiben an der Reagenzglaswand in die befüllten Reagenzgläser überführt. Der gesamte Ansatz wurde durchmischt und anschließend durch eine Filternutsche in einen Zentrifugenbecher gegossen. Für jeden Pilz wurde eine separate Filternutsche sowie ein separater Zentrifugenbecher verwendet. Die Suspensionen wurden für 10 Minuten bei 3 000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgenommen. Der Bodensatz wurde mit 10 ml sterilem, demineralisiertem Wasser gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3 000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, so dass die Sporen insgesamt dreimal gewaschen wurden. Der Bodensatz wurde in 3-5 ml sterilem, demineralisiertem Wasser aufgenommen und die Konzentration der Sporen mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt (siehe 4.4). Die vorbereitete Sporensuspension wurde bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Herstellung der Mischsuspension wurden die einzelnen Sporensuspensionen gemischt und final auf $1 \cdot 10^6$ Sporen/ml eingestellt.

4.7 Bestimmung des MIT und BIT Gehalts

4.7.1 Dispersionsfarben

Die Bestimmung des MIT und BIT Gehalts erfolgte mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Dazu wurde 1 g der Probe mit 10 ml Methanol unter Rühren für 30 min extrahiert. Anschließend wurde 1 ml dieser Lösung bei 14 000 U/min und 4 °C für 40 min zentrifugiert. Die Analyse erfolgte mittels Agilent 1290 Infinity System mit DAD. Hierzu wurde 1 μ l der Probe auf einer H12Poroschell 120 EC-C18 Säule (100 cm*4,6 cm, 2,7 μ m) mit Vorsäule bei einer Flussrate von 0,75 ml/min und Acetonitril/Wasser (Tabelle 6) als Laufmittel bei 40 °C getrennt. Zur Detektion wurde ein DAD bei 280 nm (MIT) und 320 nm (BIT) verwendet. Je Ansatz wurden fünf Parallelproben verwendet.

Tabelle 6: Acetonitril/Wassergradient

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser [%]
0	10	90
1	10	90
5	90	10
6	90	10
6,2	10	90
8	10	90

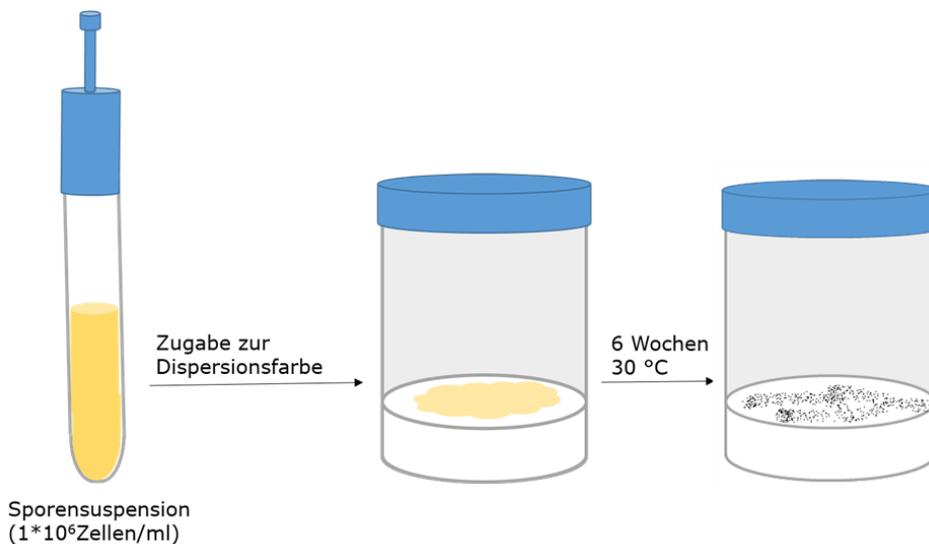
4.7.2 Dispersionsklebstoffe

Die Bestimmung des MIT und BIT Gehalts erfolgte mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Dazu wurde 1 g der Probe mit 10 ml eines Lösungsmittelgemisches (H₂O/ACN/H₂SO₄, 7:2:1) unter Rühren für 30 min extrahiert und folgend für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde 1 ml dieser Lösung bei 14000 U/min und 4 °C für 40 min zentrifugiert und der Ansatz durch einen Filter aus regenerierter Cellulose mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert. Die Analyse erfolgte mittels Agilent 1290 Infinity System mit DAD. Hierzu wurde 1 µL der Probe auf einer H12Poroschell 120 EC-C18 Säule (100 cm*4,6 cm, 2,7 µm) mit Vorsäule bei einer Flussrate von 0,75 ml/min und Acetonitril/Wasser als Laufmittel bei 40 °C getrennt. Zur Detektion wurde ein DAD bei 280 nm (MIT) und 320 nm (BIT) verwendet.

4.8 Gebrauchstauglichkeitstest

Der Gebrauchstauglichkeitstest wurde nach der z.Zt. gültigen Vorschrift der Checkliste zur stofflichen Bewertung im Rahmen des Aufnahmeverfahrens für weitere Topfkonservierer gemäß des Anhangs 1 zur Vergabegrundlage RAL-UZ102 „Emissionsarme Innenwandfarben“ durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der wiederkehrenden Belastung eines Produkts (z.B. Farbe, Klebstoff) durch Beimpfung mit einer hohen Konzentration von Mikroorganismen (Pilzsporen, Hefen oder Bakterien) in einwöchigen Intervallen. Vor jeder neuen Beimpfung wird ein Aliquot des Produkts entnommen, um den Gehalt an koloniebildenden Einheiten auf einem künstlichen Nährmedium zu bestimmen. Bei Versuchen mit Schimmelpilzen wurde die Sporensuspension auf die Oberfläche des Produktes gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Probe auf der Oberfläche verteilt. Da das Wachstum in diesem Fall nicht über eine Keimzahlbestimmung erfolgen kann, wurde die Auswertung rein visuell vorgenommen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2: Belastungstest mit Schimmelpilzsporen



Im Rahmen des Vorhabens wurden dabei folgende Veränderungen bei der Durchführung vorgeschlagen:

- Berücksichtigung einer künstlichen Alterung durch erhöhte Temperatur
- Herabsetzen der Inokulationszyklen von sechs auf drei unter Beibehaltung der sehr hohen Keimbelastung
- Einführen des Tests für Hefe- und Schimmelpilze, wobei diese getrennt voneinander betrachtet werden müssen, da es sich bei Schimmelpilzen um ein Oberflächenproblem handelt
- Quantitative Bestimmung der KBE/ml bei jedem Inokulationszyklus
- Einführen eines pass/fail Kriteriums und einer Validitätsprüfung

Die Untersuchungen, die zu den Änderungsvorschlägen führen, sind im Kapitel 5 dargestellt. Die Anweisung zur Durchführung des überarbeiteten Gebrauchstauglichkeitstests befindet sich im Anhang (Anhang 8.1-8.3).

4.9 Molekularbiologische Methoden

4.9.1 Präparation chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA aus *P. aeruginosa* erfolgte mit dem Soil DNA Isolation Plus Kit der Firma Norgen Biotek Corp. nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) gemessen. Für die Bestimmung des Reinheitsgrades wurde das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 zu 280 nm ermittelt. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 lagen reine DNA-Präparationen vor.

4.9.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden ausgewählte DNA-Bereiche *in vitro* amplifiziert. Als Matrize diente hierbei chromosomale DNA aus und *P. aeruginosa* (BAM 60). Die Amplifikationen erfolgten im Mastercycler epgradient S der Firma Eppendorf. Zur Amplifikation eines 16 S DNA-Abschnittes kamen folgende universelle Primer zum Einsatz:

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
1492r	GTT TAC CTT GTT ACG ACT T

Für den PCR-Ansatz wurde genomische DNA mit 200 µM dNTP-Mix, 100 pmol forward Primer, sowie 100 pmol reverse Primer, 2,5 U Taq-Polymerase in PCR-Puffer gemischt.

Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Denaturierung der DNA	3 min	94°C	
Denaturierung der DNA	30 s	94°C	← 35 Zyklen
Annealing	30 s	52°C	
Elongation	1 min	72°C	
Abschluss Elongation	5 min	72°C	
Kühlen		4°C	

4.9.2.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Durchführung der qPCR erfolgte in einem MX3005PTM Gerät der Firma Stratagene. Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green wurde die Zunahme des PCR Produkts verfolgt. Zur Amplifikation des 16S DNA-Abschnittes kamen folgende universelle Primer zum Einsatz:

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
338r	GCT GCC TCC CGT AGG AGT

Für einen 10µl PCR-Ansatz wurde 1 µl genomische DNA mit jeweils 1 µl Primer (forward und reverse je 10 pmol), 5 µl iTaq universal SYBR Green supermix BioRad (2x) in 2 µl nukleasefreiem Wasser gemischt.

Tabelle 9: Temperaturprofil qPCR

	Phase	Dauer	Temperatur
1x	Initialdenaturierung	2 min	95°C
	Denaturierung	15 s	95°C
40x	Primer-Anlagerung / Elongation	15 s	60°C
Schmelzkurve			
1x	Denaturierung	1 min	95°C
1x	SYBR Green Anlagerung	30 s	55°C
1x	Denaturierung	30 s	95°C

4.9.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte mittels horizontaler Elektrophorese in 1%-igen Agarosegelen in 1x TBE-Puffer (10x Stock: 900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 25 mM EDTA; pH 8,2-8,3). Die Proben wurde mit 6x Ladepuffer (10 mM Tris-HCL (pH 7,6), 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt. Als Größenstandard diente eine kB-DNA Leiter der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden die Gele für 30 Minuten in einer GelRed Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Das Ergebnis wurde mittels Kamera dokumentiert.

5 Ergebnisse

5.1 Revision des Gebrauchstauglichkeitstests

Im Rahmen des Vorhabens erfolgte die Überarbeitung der zurzeit gültigen Prüfmethode zur Gebrauchstauglichkeit von Topfkonservierern in Gebinden anhand weißer Innenraumdispersionsfarbe. Hierzu wurden Farben mit unterschiedlichen Bindemitteln und Konservierungsmitteln eingesetzt. Der Belastungstest wurde mit den laut RAL-UZ 12a gelisteten Mikroorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *A. faecalis*) durchgeführt, welche laut Vertretern der betroffenen Industrie das Spektrum an möglichen Bakterien in Farben gut widerspiegeln. Des Weiteren wurden auch Hefe- und Schimmelpilze bei dem Testverfahren berücksichtigt.

5.1.1 Weiße Innenraumdispersionsfarbe mit Polyvinylacetat-Ethylen als Bindemittel

Die Dispersionsfarben, die in dem Testverfahren verwendet wurden, enthielten zwei verschiedene Konzentrationen an Polyvinylacetat-Ethylen als Bindemittel (8,8 % und 28,8 %) und waren mit einer Konservierungsmittelkombination aus MIT und BIT (je 100 ppm) versehen (Tabelle 1).

5.1.1.1 Bakterien

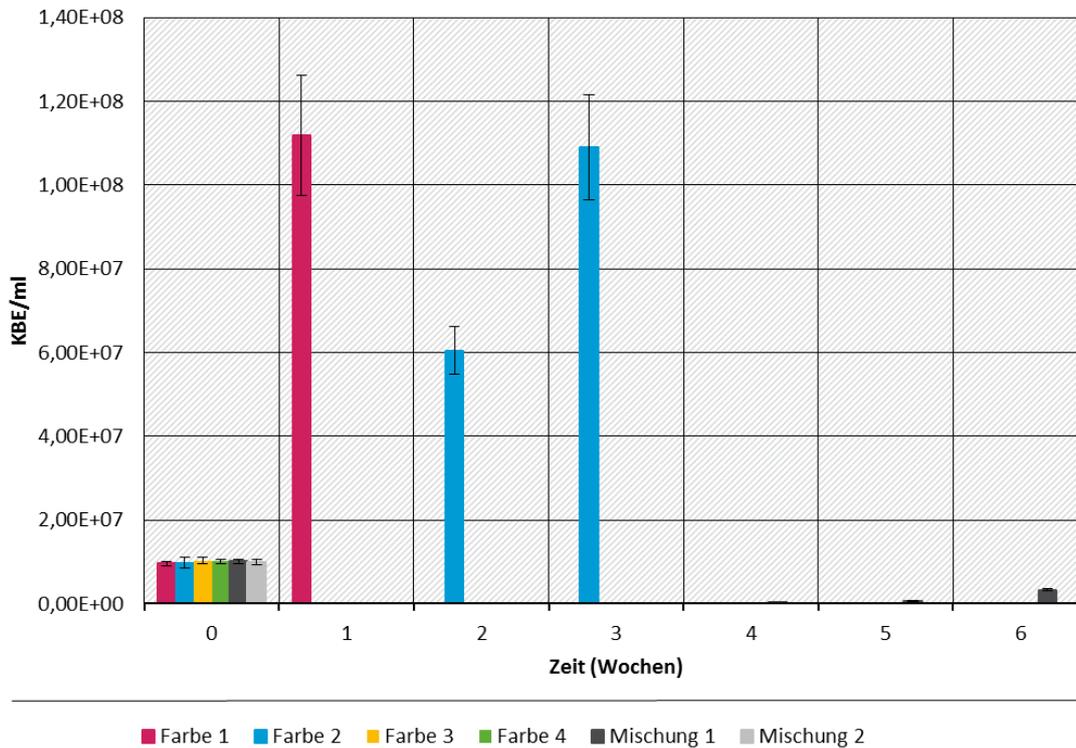
Die Farbproben wurden in wöchentlichem Abstand sechsmal 1 %-ig mit einer Bakteriensuspension beimpft und anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ KBE/ml (kolonienbildende Einheit/Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von $1 \cdot 10^7$ KBE/ml in der beimpften Farbe. Die Lebendzellzahl wurde wöchentlich durch Bestimmung der KBE/ml ermittelt.

Wie in dem bestehenden Test vorgesehen, wurden die Proben, bei denen ein Wachstum vorlag, im weiteren Verlauf nicht weiter berücksichtigt, während Proben, die kein Wachstum zeigten, bis zu 6 Mal beimpft wurden. Maximal lagen folglich $6 \cdot 10^7$ KBE/ml in der Farbe vor, die nur durch Beimpfung der Farbe zugesetzt worden waren. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 dargestellt. Wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, wurde lediglich im Falle der Farbe 1 (Konservierungsmittelintrag ausschließlich über die Rohstoffe, Bindemittelgehalt 8,8 %) ein deutliches Wachstum der Bakterien in der Farbe verzeichnet. Bei Farbe 2 (Konservierungsmittelintrag ausschließlich über die Rohstoffe, Bindemittelgehalt 28,8 %) wurde erst nach zwei Wochen ein Wachstum von Bakterien beobachtet. Ab einem Testzeitraum von vier Wochen wuchsen bei Mischung 1 Kolonien auf den Nähragarplatten, deren Anzahl über die nächsten zwei Wochen weiterhin zunahm. Bis zum Versuchsende wurde bei Mischung 1 jedoch kein Wachstum beobachtet; die Zellzahl lag stets unterhalb der Zellzahl des Inokulums ($3,34 \cdot 10^6$ KBE/ml nach sechs Wochen). Farbe 3, Farbe 4 und Mischung 2 zeigten über den gesamten Testzeitraum kein Wachstum oder Überleben von Bakterien.

Abbildung 3: Belastungstest mit Bakterien in VA/E-haltiger Farbe

Bestimmung der kolonienbildenden Einheit

Bindemittel Vinylacetat/Ethylen



Quelle: BAM

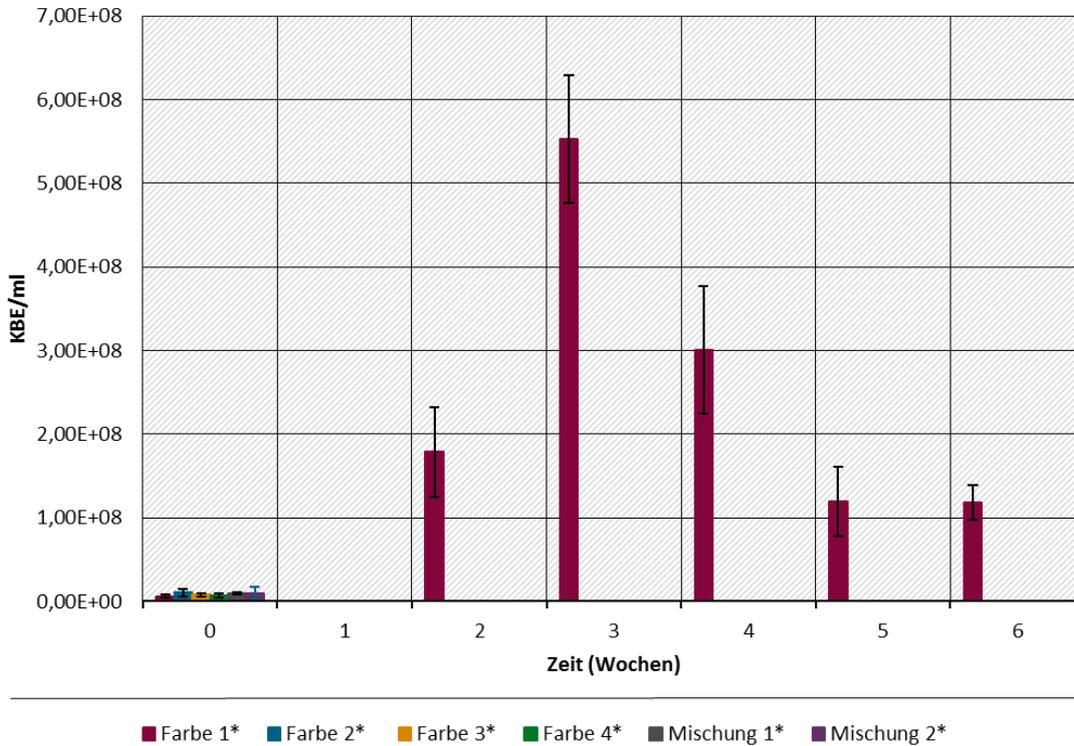
Künstliche Alterung

Bei der zurzeit gültigen Prüfmethode zur Vergabe des Blauen Engels wird vor dem biologischen Belastungstest keine künstliche Alterung an dem konservierten Produkt vorgenommen. Im Rahmen des Projektes wurde die Besiedelbarkeit der Produkte durch Mikroorganismen unter Einbeziehung einer künstlichen, zeitraffenden Alterung überprüft. Dazu wurden die Proben zunächst für vier Wochen bei 40 °C gelagert und folgend dem Belastungstest unterzogen. Zur Überprüfung des Wachstumsverlaufs wurden in diesem Testzyklus alle Proben unabhängig von bakteriellem Wachstum über einen Zeitraum von sechs Wochen mitgeführt (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Belastungstest mit Bakterien in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung

Bindemittel Vinylacetat/Ethylen



Quelle: BAM

Nach der künstlichen Alterung wurde lediglich ein Wachstum von Bakterien bei Farbe 1 beobachtet. Verglichen mit dem vorherigen Test erfolgte das Wachstum um eine Woche verzögert. Bei allen anderen Proben wurde über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen trotz sechsmaliger Beimpfung kein Wachstum von Bakterien oder das Auftreten von Kolonien verzeichnet.

Analyse der Biozidkonzentration

Mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) wurde die Konzentration an MIT und BIT in der Innenraumdispersionsfarbe nach Lieferung der Farben bestimmt. Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses der künstlichen Alterung auf den Gehalt an MIT und BIT wurde auch nach der Inkubation der Proben für vier Wochen bei 40 °C der Biozidgehalt in den konservierten Proben bestimmt. Des Weiteren erfolgte eine Messung aller Proben nach Abschluss des Belastungstests (Tabellen 10 und 11).

Tabelle 10: MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

MIT	Ausgangswert	nach Alterung (4 Wochen 40 °C)	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	9,51 ± 0,71	nb	0,00 ± 0,00	7,57 ± 0,13
2	24,07 ± 0,64	nb	19,61 ± 0,45	20,83 ± 0,21
3	85,52 ± 0,38	78,81 ± 1,64	73,67 ± 1,30	78,95 ± 0,7
4	88,70 ± 3,28	79,74 ± 1,03	71,33 ± 5,28	72,45 ± 6,23
Mischung 1	45,42 ± 0,43	nb	40,96 ± 7,00	40,71 ± 8,50
Mischung 2	49,37 ± 5,30	nb	44,63 ± 2,58	51,63 ± 1,06

nb: nicht bestimmt

Tabelle 11: BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Alterung (4 Wochen 40 °C)	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	6,24 ± 0,36	nb	0,00 ± 0,00	0,82 ± 0,10
2	18,21 ± 0,6	nb	3,55 ± 0,38	3,71 ± 0,22
3	77,03 ± 1,31	55,43 ± 1,36	40,52 ± 2,4	44,14 ± 0,81
4	75,29 ± 3,30	39,61 ± 1,17	21,33 ± 2,07	25,50 ± 3,09
Mischung 1	37,02 ± 0,48	nb	15,95 ± 2,5	18,26 ± 3,93
Mischung 2	35,85 ± 5,07	nb	10,81 ± 1,21	13,00 ± 1,12

nb: nicht bestimmt

Nach einer Inkubation der Proben für vier Wochen bei 40 °C wurde eine Abnahme in dem Gehalt an MIT und BIT nachgewiesen, wobei für BIT eine deutlich stärkere Abnahme verzeichnet wurde. Insgesamt wurde ein Einfluss der künstlichen Alterung sowohl auf den Biozidgehalt als auch auf das Wachstum von Bakterien gezeigt. Hinsichtlich des Biozidgehalts wurde in Abhängigkeit von der Belastung durch Bakterien keine deutliche Veränderung beobachtet.

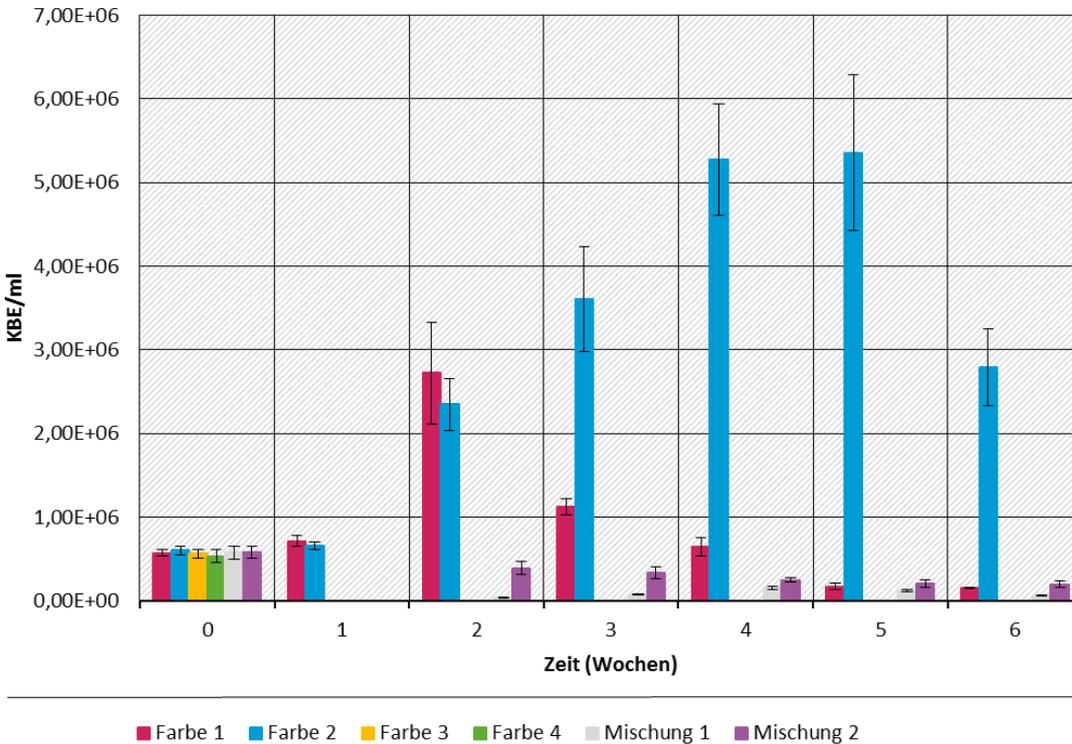
5.1.1.2 Hefen

Zurzeit prüft der biologische Gebrauchstauglichkeitstest nur mit Bakterien; Schimmel- und Hefepilze werden nicht berücksichtigt. Gespräche mit den Industrievertretern zeigten jedoch, dass verschiedene Umweltheffarten, z.B. aus der Gattung Candida, mit im Fokus der Betriebshygiene stehen. In Folge dessen wurde beschlossen, Hefen als wichtige Prüforganismen für den Belastungstest mit einzubeziehen (Tabelle 4). Analog zum vorherigen Test mit Bakterien wurden zwei Farbmischungen hergestellt, die eine reduzierte Biozidkonzentration aufwiesen: Mischung 1 wurde durch Mischen der Farbe 1 und Farbe 3 im Verhältnis 1:1 hergestellt, Mischung 2 durch Mischen der Farbe 2 und Farbe 4 im Verhältnis 1:1. Die Innenraumdispersionsfarbe wurde in wöchentlichem Abstand sechsmal 1 %-ig mit einer Hefesuspension beimpft. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml. Anschließend wurden die Proben bei 30 ± 2 °C gelagert und die Lebendzellzahl wöchentlich durch Bestimmung der KBE ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5: Belastungstest mit Hefen in VA/E-haltiger Farbe

Bestimmung der koloniebildenden Einheit

Bindemittel Vinylacetat/Ethylen



Quelle: BAM

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, wuchsen die Hefen ausschließlich in den Farben, bei denen der Eintrag an Konservierungsmitteln ausschließlich über die Rohstoffe erfolgte. Bei Farbe 1 wurde nach zwei Wochen ein Maximum im Wachstum verzeichnet. Anschließend nahm die Zellzahl über den gesamten Versuchszeitraum ab. Im Falle der Farbe 2 wurde ein kontinuierliches Wachstum über die Zeit beobachtet, wobei nach 4 bis 5 Wochen das Maximum erreicht wurde. Anschließend wurde auch hier eine Abnahme in der Zellzahl beobachtet. Bei den Mischungen wurden in beiden Fällen Kolonien nachgewiesen. Zu keinem Zeitpunkt lag jedoch ein Wachstum vor; die Zellzahl lag immer unter der Zellzahl des Inokulums (in Mischung 1: $6,6 \cdot 10^4$ KBE/ml, in Mischung 2: $1,9 \cdot 10^5$ KBE/ml nach sechs Wochen Belastungstest). Bei den konservierten Proben (Farbe 3 und 4) hingegen wurde weder ein Wachstum der Hefen noch das Auftreten von Kolonien verzeichnet.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde vor und nach Abschluss des Belastungstests die Konzentration von MIT und BIT in der Innenraumdispersionsfarbe bestimmt (Tabellen 12 und 13).

Tabelle 12: MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Hefen

MIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,75 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	22,14 ± 0,03	0,00 ± 0,00	21,50 ± 0,27
3	75,98 ± 0,12	71,81 ± 1,47	76,47 ± 1,00
4	77,86 ± 0,05	70,75 ± 0,96	75,69 ± 1,40
Mischung 1	56,52 ± 0,16	0,39 ± 0,15	0,64 ± 0,11
Mischung 2	64,59 ± 0,83	0,00 ± 0,00	43,27 ± 1,93

Tabelle 13: BIT-Gehalt in VA/E-haltiger nach Belastungstest mit Hefen

BIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	2,52 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	12,58 ± 0,06	1,99 ± 0,121	6,87 ± 0,17
3	53,59 ± 0,08	45,02 ± 0,676	45,40 ± 0,323
4	48,44 ± 0,05	34,64 ± 0,880	35,79 ± 0,88
Mischung 1	41,03 ± 0,04	12,71 ± 6,876	9,01 ± 1,61
Mischung 2	36,19 ± 0,29	1,69 ± 0,303	16,46 ± 0,73

Bei Farbe 2 und Mischung 2 wurde eine deutliche Veränderung des Biozidgehalts in Abhängigkeit von der Belastung durch Hefen beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die Biozide durch die Hefen abgebaut wurden. In den konservierten Farben 3 und 4 konnte keinerlei Beeinflussung des Biozidgehalts durch die Hefen gezeigt werden. In diesen Fällen war die Konzentration an Konservierungsmittel vermutlich zu hoch, so dass die Hefen bereits abgetötet wurden, bevor ein Abbau von MIT und BIT durch diese stattfinden konnte.

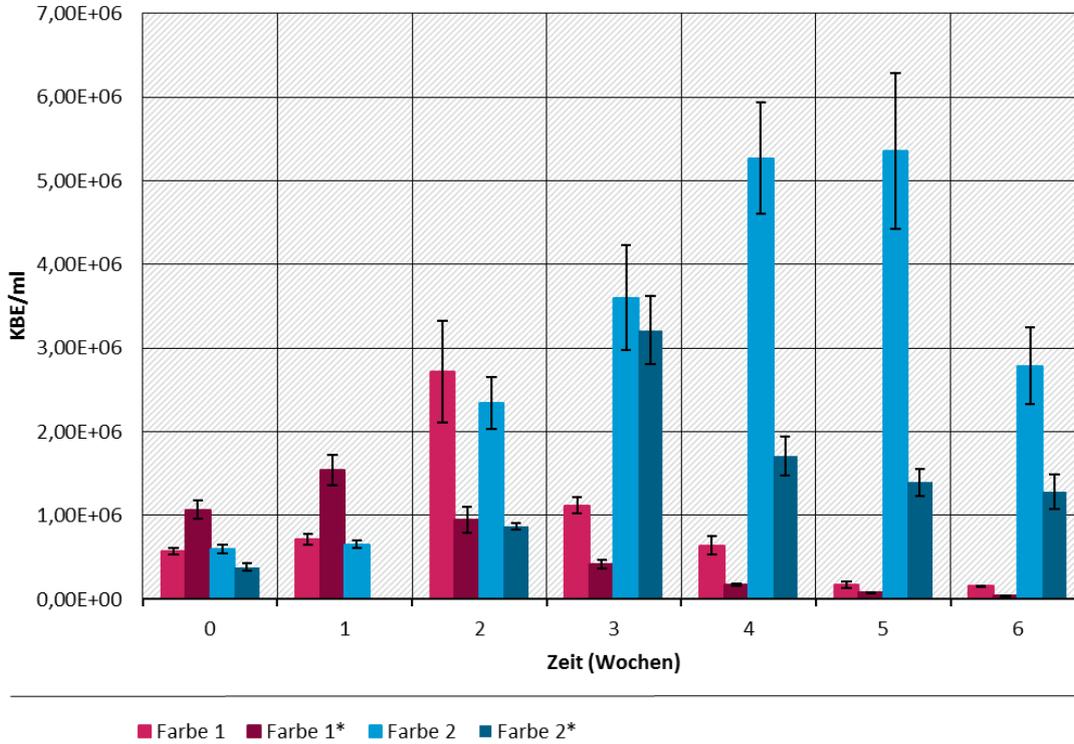
Künstliche Alterung

Für die künstliche Alterung wurden die Proben zunächst für vier Wochen bei 40 °C gelagert. Anschließend wurde der Belastungstest mit Hefen durchgeführt. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, wuchsen die Hefen auch nach der künstlichen Alterung in den Farben 1 und 2, bei denen der Konservierungsmittelintrag ausschließlich über die Rohstoffe erfolgte. Farbe 1, mit einem Bindemittelgehalt von 8,8 %, zeigte ein maximales Wachstum nach einer Woche, wohingegen für die Farbe mit einem Bindemittelgehalt von 28,8 % (Farbe 2) die höchste Zellzahl nach drei Wochen bestimmt wurde. Vergleicht man die Daten mit den ungealterten Proben, wurde das maximale Wachstum bei beiden Farben eine Woche früher erreicht, wenngleich das Wachstum insgesamt schwächer ausfiel als bei den Proben, die keiner Alterung unterzogen wurden.

Abbildung 6: Belastungstest Farbe 1 und Farbe 2 mit Hefen in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung

Bindemittel Vinylacetat/Ethylen



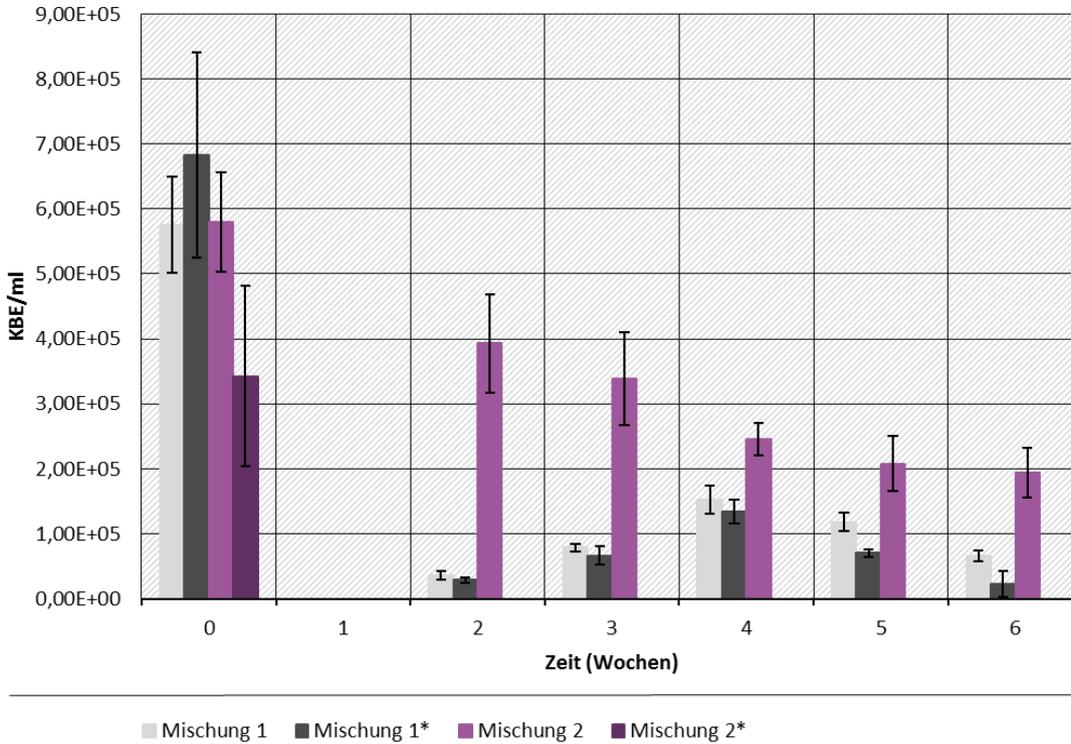
Quelle: BAM

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für die Mischungen (Abbildung 7). Bei Mischung 1 wurden auch nach der künstlichen Alterung Kolonien nachgewiesen, jedoch war die Keimzahl etwas geringer als bei der nicht gealterten Probe ($2,3 \cdot 10^4$ KBE/ml nach sechs Wochen Belastungstest). Insgesamt lag die Zellzahl bei Mischung 1 immer unter der Zellzahl des Inokulums, so dass bei dieser Probe kein Wachstum vorlag. Bei Mischung 2 hingegen wurden nach der künstlichen Alterung keine Kolonien mehr nachgewiesen. Die gealterte Mischung 2 zeigte bereits kurz nach der Beimpfung mit Hefekeimen (Woche 0) und der direkt darauffolgenden Entnahme eines Aliquots aus der Mischung 2 zur Bestimmung der Wiederfindung eine Hefe abtötenden Wirkung.

Abbildung 7: Belastungstest Mischung 1 und Mischung 2 mit Hefen in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung

Bindemittel Vinylacetat/Ethylen



Quelle: BAM

Analyse der Biozidkonzentration

Der Gehalt an MIT und BIT in den Proben wurde vor und nach der künstlichen Alterung sowie nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 14 und 15).

Tabelle 14: MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	1,8 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	22,11 ± 0,17	21,32 ± 0,07	0,00 ± 0,00	20,28 ± 0,26
3	77,45 ± 0,62	76,84 ± 0,83	74,56 ± 0,32	75,58 ± 1,78
4	74,49 ± 1,23	72,72 ± 0,49	68,69 ± 2,27	73,07 ± 0,82
Mischung 1	38,65 ± 0,13	37,25 ± 2,81	0,18 ± 0,06	37,52 ± 4,48
Mischung 2	54,15 ± 0,64	50,45 ± 1,05	41,05 ± 3,50	50,03 ± 0,29

Tabelle 15: BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	2,77 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	11,07 ± 0,01	6,85 ± 0,246	0,00 ± 0,00	4,02 ± 0,37
3	48,14 ± 0,14	43,63 ± 0,64	40,47 ± 1,09	39,94 ± 1,32
4	40,52 ± 0,35	34,10 ± 0,61	26,77 ± 1,37	28,26 ± 0,68
Mischung 1	24,85 ± 0,08	21,31 ± 1,64	3,25 ± 0,58	17,62 ± 2,12
Mischung 2	29,35 ± 0,26	22,27 ± 0,45	13,41 ± 1,63	16,47 ± 0,11

Insgesamt wurde ein Einfluss der künstlichen Alterung sowohl auf den Biozidgehalt der Farben als auch auf das Wachstum von Hefen gezeigt. Bei Farbe 2 und den beiden Mischungen wurde eine deutliche Veränderung des Biozidgehalts in Abhängigkeit von der Belastung durch Hefen beobachtet. Wie bei den ungealterten Proben war bei Farbe 3 und Farbe 4 keine Veränderung im Biozidgehalt nach dem Belastungstest zu verzeichnen. Bei Farbe 1, bei der das Konservierungsmittel nur durch das Bindemittel eingetragen wurde, war nach der Alterung weder MIT noch BIT nachweisbar.

5.1.1.3 Schimmelpilze

Schimmelpilze entwickeln sich vor allem an der Oberfläche von Dispersionsfarben oder an den Seitenwänden des Gebindes, wenn diese nur geringfügig mit Farbe benetzt sind. Daher wurde bei den Versuchen die Sporensuspension lediglich auf die Oberfläche des Produktes gegeben und nicht mit der Farbe vermischt. Die Innenraumdispersionsfarbe wurde in wöchentlichem Abstand sechsmal 1 %-ig mit der Sporensuspension inokuliert. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 1×10^6 Sporen/ml eingestellt und durch vorsichtiges Schwenken der Probe auf der Oberfläche verteilt. Anschließend wurden die Proben bei 30 ± 2 °C gelagert. Da das Wachstum in diesem Fall nicht über eine Keimzahlbestimmung erfolgen kann, wurde die Auswertung rein visuell vorgenommen. Zur Vitalitätskontrolle der Schimmelpilze wurde die Sporensuspension auf Nähragarplatten ausgestrichen und die Platten für maximal 7 Tage bei 30 ± 2 °C bebrütet. Wie bei den Versuchen mit Bakterien und Hefen beschrieben, wurden die Versuche mit den Schimmelpilzen auch mit künstlich gealterten Proben durchgeführt. Über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen wurde lediglich in der Farbe mit einem hohen Bindemittelgehalt (Farbe 2, Eintrag an Konservierungsmitteln ausschließlich über die Rohstoffe) das Wachstum von Schimmelpilzen nach der künstlichen Alterung beobachtet (Abbildung 8). Alle anderen Proben (gealtert und ungealtert) zeigten während des gesamten Versuchszeitraums keine Ausbildung von Schimmel.

Abbildung 8: Farbe 2 nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelsporen im Prüfgebände (Öffnungsdurchmesser 62 mm)



Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor Versuchsbeginn und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 16 und 17).

Tabelle 16: MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

MIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,75 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	22,14 ± 0,03	20,51 ± 0,38	21,50 ± 0,27
3	75,98 ± 0,12	74,15 ± 2,89	76,47 ± 1,00
4	77,86 ± 0,05	70,14 ± 1,88	75,69 ± 1,40
Mischung 1	56,52 ± 0,16	0,453 ± 0,47	0,64 ± 0,11
Mischung 2	64,59 ± 0,83	43,63 ± 2,95	43,27 ± 1,93

Tabelle 17: BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

BIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	2,52 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	12,58 ± 0,06	6,99 ± 0,13	6,87 ± 0,18
3	53,59 ± 0,08	46,67 ± 2,14	45,41 ± 0,32
4	48,44 ± 0,05	35,61 ± 1,19	35,79 ± 0,89
Mischung 1	41,03 ± 0,04	9,16 ± 1,59	9,01 ± 1,62
Mischung 2	36,20 ± 0,25	17,27 ± 1,75	16,46 ± 0,74

Nach Abschluss des Belastungstests wurde keine Veränderung des Biozidgehalts in Abhängigkeit von der Belastung durch Schimmelpilze beobachtet.

Analyse der Biozidkonzentration nach künstlicher Alterung

Tabelle 18: MIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	1,8 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	22,11 ± 0,17	21,32 ± 0,07	0,00 ± 0,00	20,27 ± 0,26
3	77,45 ± 0,62	76,84 ± 0,83	73,19 ± 2,71	75,58 ± 1,78
4	74,49 ± 1,23	72,72 ± 0,49	69,54 ± 1,56	73,071 ± 0,82
Mischung 1	38,65 ± 0,13	37,25 ± 2,81	38,47 ± 4,61	37,52 ± 4,48
Mischung 2	54,15 ± 0,64	50,45 ± 1,05	43,30 ± 4,68	50,03 ± 0,29

Tabelle 19: BIT-Gehalt in VA/E-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	2,77 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	11,07 ± 0,01	6,85 ± 0,25	0,00 ± 0,00	4,02 ± 0,37
3	48,14 ± 0,14	43,63 ± 0,65	41,04 ± 2,15	39,94 ± 1,32
4	40,52 ± 0,35	34,10 ± 0,61	27,41 ± 1,43	28,26 ± 0,68
Mischung 1	24,85 ± 0,08	21,31 ± 1,61	20,24 ± 2,95	17,66 ± 2,12
Mischung 2	29,35 ± 0,26	22,27 ± 0,45	14,70 ± 2,25	16,47 ± 0,11

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor dem Versuch, nach der künstlichen Alterung und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 18 und 19). Es zeigte sich, dass durch Alterung der Dispersionsfarbe bei 40 °C über einen Zeitraum von vier Wochen eine leichte Abnahme in der Konzentration von MIT und BIT erfolgte. Nach dem Versuchszeitraum von sechs Wochen wurde keine wesentliche Veränderung des Biozidgehalts in Abhängigkeit von der Belastung durch Schimmelpilze beobachtet. Eine Ausnahme bildet hier Farbe 2, bei der nach Alterung und dem Belastungstest weder MIT noch BIT nachweisbar war. Vermutlich wurde hier das Biozid durch die Schimmelpilze vollständig abgebaut, was sich auch in einem Wachstum der Schimmelpilze an der Oberfläche von Farbe 2 widerspiegelt (Abbildung 9).

5.1.2 Weiße Innenraumdispersionsfarbe mit Reinacrylat als Bindemittel

Die Werksbegehungen und die Diskussionen mit den Industrievertretern zeigten, dass viele verschiedene Rezepturen für weiße Wandfarben existieren. Für die Überarbeitung der Methode des Blauen Engels wurde eine Farbe mit Polyvinylacetat-Ethylen als Bindemittel eingesetzt. Da in der Praxis häufig Kunstharzdispersionen verwendet werden, wurde der Versuch auch mit einer Farbe durchgeführt, in der Acrylharz als Bindemittel zum Einsatz kommt. Die Farben wurden aus der Industrie zur Verfügung gestellt und waren so angesetzt, dass sie sich in ihrer Zusammensetzung nur in der Art des Bindemittels unterschieden. Auf diese Weise war es möglich, den Einfluss des Bindemittels auf die Durchführbarkeit und die Resultate der entwickelten Testmethode zu untersuchen.

Im vorherigen Versuchsablauf wurden die Proben sechsmalig mit einer sehr hohen Keimbelastung beimpft ($1 \cdot 10^9$ KBE/ml). Da diese hohe Keimbelastung bei entsprechender Werkshygiene als unwahrscheinlich angesehen werden kann, wurde entschieden, in den folgenden Versuchen die Farbproben nur dreimalig mit einer Mikroorganismen- bzw. Sporensuspension zu beimpfen, wobei die hohe Zellzahl bzw. Sporenkonzentration beibehalten wurde. Die koloniebildenden Einheiten wurden nach jeder Beimpfung und nach Abschluss des Gebrauchstauglichkeitstests bestimmt. Für die Versuche wurde eine Dispersionsfarbe mit einem Bindemittelgehalt von 8,8 % Dispersion verwendet, da es sich hierbei um ein handelsübliches Muster handelt. Wie im vorherigen Versuch wurden Farbe 1 und 3 gemischt, um eine Farbe mit einer mittleren Konservierungsmittelmenge zu erhalten.

5.1.2.1 Bakterien

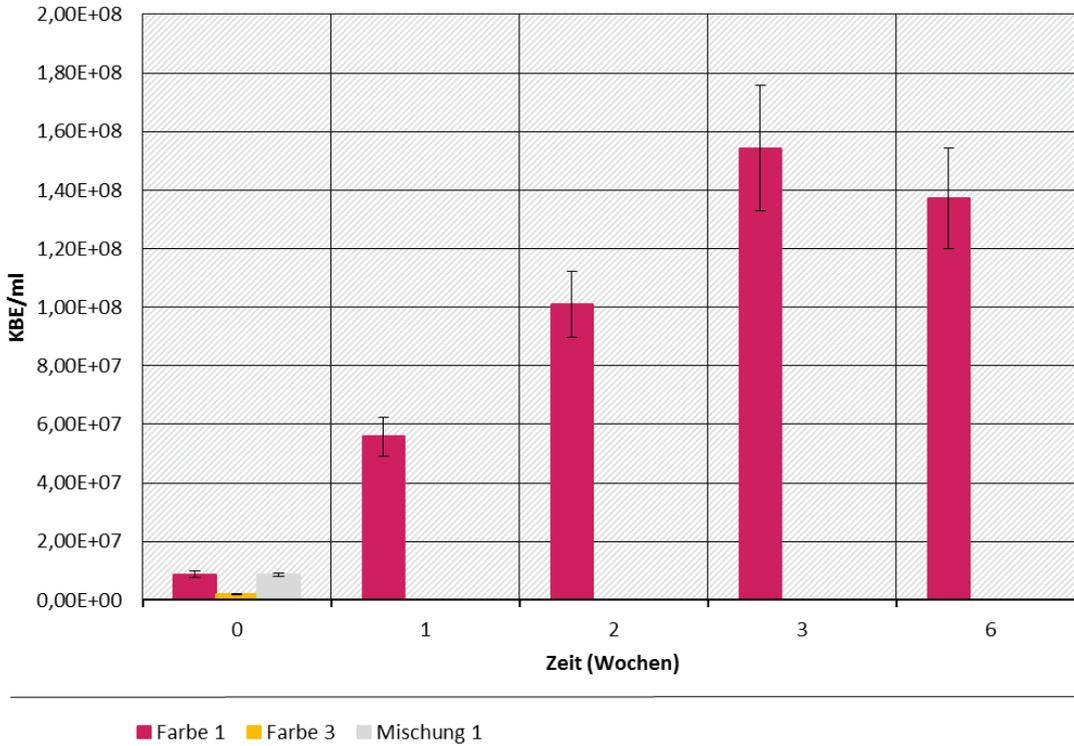
Die Farbproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Bakteriensuspension angeimpft und folgend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ KBE/ml. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach jeder Inokulation und nach Abschluss des Versuchs. Das Ergebnis des Belastungstests ist in Abbildung 9 dargestellt. Bei Farbe 1, bei der der Konservierungsmittelintrag ausschließlich über die Rohstoffe erfolgte, wurde bereits nach einer Woche ein deutliches Wachstum der Bakterien verzeichnet, welches über den gesamten Versuchszeitraum weiter anstieg.

Bei der konservierten Farbe 3 und der Mischung hingegen wurden über den gesamten Versuchszeitraum kein Wachstum der Bakterien oder ein Auftreten von Kolonien beobachtet.

Abbildung 9: Belastungstest mit Bakterien in RA-haltiger Farbe

Bestimmung der koloniebildenden Einheit

Bindemittel Reinacrylat



Quelle: BAM

Analyse der Biozidkonzentration

Nach Abschluss des Belastungstests wurde keine Veränderung des Biozidgehalts in Abhängigkeit von der Belastung durch Bakterien beobachtet (Tabellen 20 und 21).

Tabelle 20: MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Bakterien

MIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,20 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	73,27 ± 0,64	73,25 ± 1,45	76,02 ± 3,99
Mischung 1	39,28 ± 0,42	37,97 ± 0,54	41,39 ± 0,31

Tabelle 21: BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	44,20 ± 0,62	37,14 ± 1,69	40,28 ± 3,35
Mischung 1	21,96 ± 0,36	17,22 ± 0,80	19,09 ± 0,22

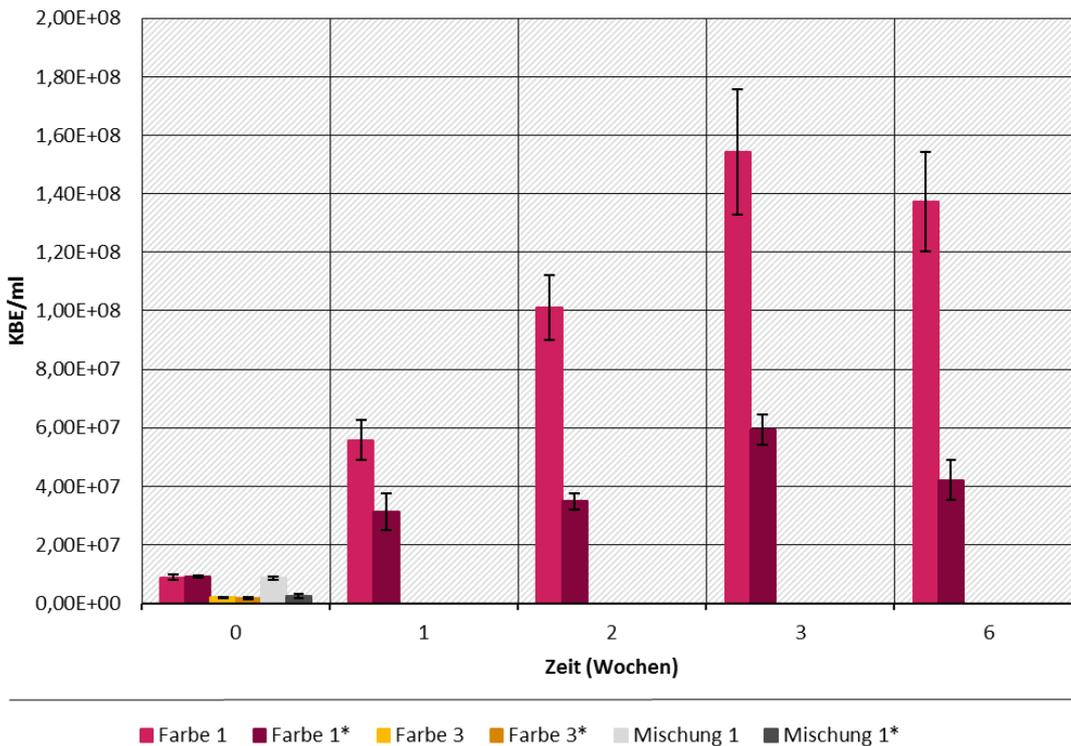
Künstliche Alterung

Nach einer vierwöchigen Inkubation bei 40 °C wurden die Farben dem Belastungstest mit Bakterien unterzogen. Wie anhand Abbildung 10 zu erkennen ist, hatte die künstliche Alterung einen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien. Wie zuvor wurde lediglich ein Wachstum bei Farbe 1 beobachtet, welches im Vergleich zu der ungealterten Farbe jedoch deutlich schwächer ausfiel.

Abbildung 10: Belastungstest mit Bakterien in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung

Bindemittel Reinacrylat



Quelle: BAM

Analyse der Biozidkonzentration nach künstlicher Alterung

Nach Abschluss der künstlichen Alterung und des Belastungstests wurde der Gehalt an MIT und BIT in den Proben bestimmt (Tabellen 22 und 23).

Tabelle 22: MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	4,58 ± 0,085	0,058 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	74,22 ± 0,20	72,81 ± 0,69	70,94 ± 1,16	73,31 ± 1,93
Mischung 1	38,61 ± 0,18	39,06 ± 0,23	37,46 ± 2,28	41,79 ± 0,98

Tabelle 23: BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	50,34 ± 0,52	43,86 ± 0,58	35,76 ± 0,92	38,19 ± 1,45
Mischung 1	24,73 ± 0,09	20,16 ± 0,08	15,84 ± 0,88	19,05 ± 0,66

Nach der künstlichen Alterung wurde eine leichte Abnahme in dem Gehalt an MIT und BIT verzeichnet. Das Vorhandensein von Bakterien hatte dabei keinen Einfluss auf den Biozidgehalt.

5.1.2.2 Hefen

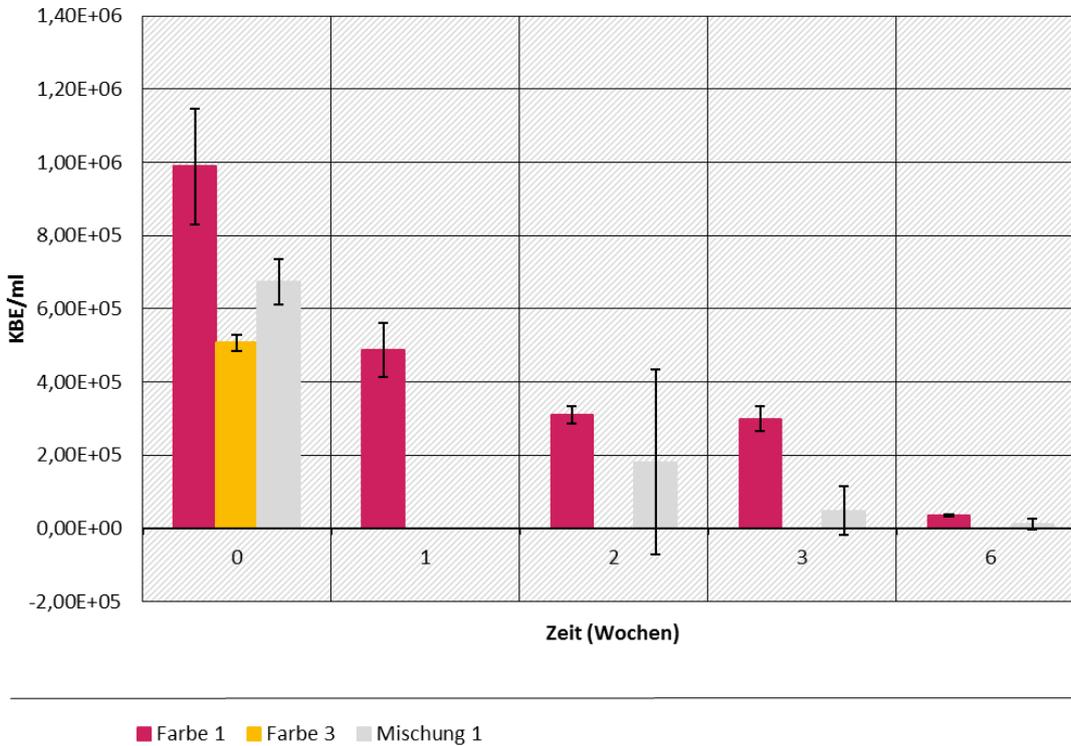
Für die Durchführung des Belastungstests mit Hefen wurden Vertreter der Gattung *Candida* eingesetzt (Tabelle 4). Die Innenraumdispersionsfarbe wurde in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Hefesuspension beimpft, welche die Prüforganismen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ KBE/ml enthielt. Anschließend wurden die Proben bei 30 ± 2 °C gelagert und die Lebendzellzahl ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

Nach einer Woche wurde bei Farbe 1 das Auftreten von Kolonien beobachtet. Über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen lag jedoch kein Wachstum vor; die Zellzahl lag immer unter der Zellzahl des Inokulums ($3,5 \cdot 10^4$ KBE/ml nach sechs Wochen Belastungstest). Wie erwartet wurde bei der konservierten Probe (Farbe 3) weder ein Wachstum noch das Auftreten von Kolonien nachgewiesen. Bei der Mischung waren zwischen den fünf Parallelproben deutliche Schwankungen hinsichtlich der Besiedelbarkeit der Farbe durch die Hefen zu erkennen. Bei zwei Proben wurde nach sechs Wochen die Ausbildung von Kolonien beobachtet, wohingegen die restlichen drei Proben keimfrei waren. Dieser Unterschied resultiert in einer sehr starken Standardabweichung wie es in Abbildung 11 zu erkennen ist.

Abbildung 11: Belastungstest mit Hefen in RA-haltiger Farbe

Bestimmung der Zellzahl

Bindemittel Reinacrylat



Quelle: BAM

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor dem Versuch und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 24 und 25).

Tabelle 24: MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Hefen

MIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	73,79 ± 0,55	72,13 ± 1,88	74,66 ± 2,82
Mischung 1	49,73 ± 0,40	14,13 ± 14,56	50,65 ± 0,67

Tabelle 25: BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Hefen

BIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	44,18 ± 0,57	37,35 ± 0,99	39,46 ± 1,07
Mischung 1	28,73 ± 0,16	8,99 ± 5,46	24,42 ± 0,18

Nach Beendigung des Belastungstests wurde eine deutliche Abnahme in dem Gehalt an MIT und BIT in Mischung 1 gemessen. Auch wenn in dieser Probe kein Wachstum stattgefunden hat ist es durchaus denkbar, dass die überlebenden Hefen zu einem Konservierungsmittelabbau geführt haben. Bei der konservierten Farbe war kein Unterschied im Biozidgehalt in Abhängigkeit von den Hefen zu erkennen.

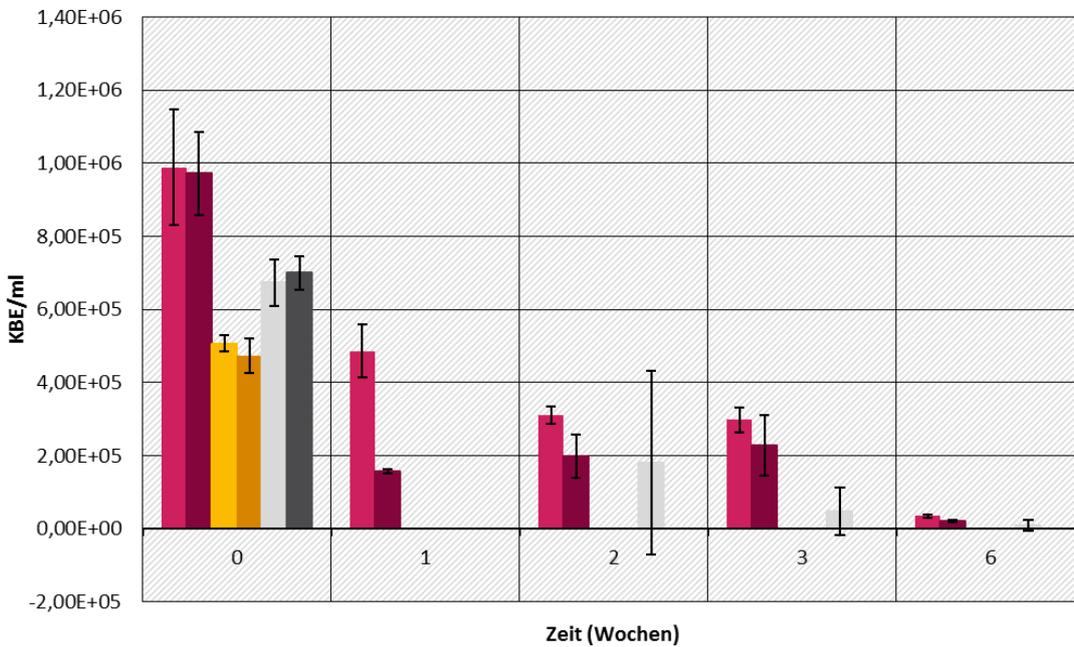
Künstliche Alterung

Nach der künstlichen Alterung wurde in keiner der getesteten Farben ein Wachstum der Hefen beobachtet. Lediglich bei Farbe 1 waren Kolonien nachweisbar, die Zellzahl lag jedoch zu jedem Zeitpunkt unter der Inokulumstärke. Bei Mischung 1 konnte nach der künstlichen Alterung kein Auftreten von Kolonien beobachtet werden (siehe Abbildung 12).

Abbildung 12: Belastungstest mit Hefen in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung

Bindemittel Reinacrylat



■ Farbe 1 ■ Farbe 1* ■ Farbe 3 ■ Farbe 3* ■ Mischung 1 ■ Mischung 1*

Quelle: BAM

Analyse der Biozidkonzentration nach künstlicher Alterung

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor Versuchsbeginn und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 26 und 27).

Tabelle 26: MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	1,75 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	72,66 ± 0,43	71,71 ± 1,45	71,91 ± 2,44	79,67 ± 6,26
Mischung 1	49,92 ± 1,100	50,12 ± 2,23	43,14 ± 5,24	48,03 ± 7,48

Tabelle 27: BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Hefen

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	46,97 ± 0,19	41,78 ± 0,47	31,73 ± 0,89	40,71 ± 2,57
Mischung 1	31,83 ± 1,04	28,04 ± 1,45	18,54 ± 2,32	21,53 ± 4,11

Wie den Tabellen 26 und 27 zu entnehmen ist, wurde kein Einfluss der künstlichen Alterung auf den Gehalt an MIT und BIT beobachtet. Auch die Anwesenheit von Hefen hatte keinerlei Auswirkungen.

5.1.2.3 Schimmelpilze

Für den Belastungstest mit Schimmelpilzen wurden die Farben in wöchentlichem Abstand dreimal 1%-ig mit einer Sporensuspension inokuliert, die auf eine Konzentration von 1×10^6 Sporen/ml eingestellt und durch vorsichtiges Schwenken der Probe auf der Oberfläche verteilt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 30 ± 2 °C gelagert. Zu keinem Zeitpunkt wurde die Ausbildung von Schimmel an der Oberfläche der Farbproben nachgewiesen. Die Vitalität des Inokulums wurde durch Ausstreichen der Sporensuspension auf Nähragarplatten bestätigt.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor Versuchsbeginn und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 28 und 29).

Tabelle 28: MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

MIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	73,79 ± 0,55	74,73 ± 2,92	74,66 ± 2,82
Mischung 1	49,72 ± 0,40	29,42 ± 4,35	50,65 ± 0,67

Tabelle 29: BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

BIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	44,18 ± 0,57	41,47 ± 1,51	39,46 ± 1,07
Mischung 1	28,73 ± 0,16	15,82 ± 2,57	24,42 ± 0,18

Nach Abschluss des Belastungstests wurde bei Mischung 1 eine deutliche Abnahme an MIT und BIT nachgewiesen. Der Gehalt an Konservierungsmitteln in Farbe 3 hingegen war nahezu unverändert.

Analyse der Biozidkonzentration nach künstlicher Alterung

Auch nach einer künstlichen Alterung und Durchführung des Belastungstests wurde keine Schimmelbildung bei den Proben nachgewiesen. Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor dem Versuch, nach der künstlichen Alterung und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabellen 30 und 31).

Tabelle 30: MIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	1,71 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	72,66 ± 0,43	71,71 ± 1,45	73,87 ± 0,98	79,67 ± 6,26
Mischung 1	49,92 ± 1,10	50,12 ± 2,23	41,92 ± 4,76	48,03 ± 7,48

Tabelle 31: BIT-Gehalt in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	46,97 ± 0,19	41,78 ± 0,47	39,13 ± 0,75	40,71 ± 2,57
Mischung 1	31,83 ± 1,04	28,04 ± 1,45	21,59 ± 2,75	21,53 ± 4,11

Wie aus den Tabellen 30 und 31 ersichtlich ist, wurde der Gehalt an Konservierungsmitteln weder durch die künstliche Alterung noch durch den Belastungstest mit Schimmelpilzsporen beeinflusst.

5.1.2.4 Vergleich der Bindemittel

Die beschriebenen Belastungstests wurden mit weißen Innenraumdispersionsfarben durchgeführt, die sich lediglich in der Art des Bindemittels unterschieden. Auf diesem Wege wurde zum einen geprüft, ob das Bindemittel einen Einfluss auf die Durchführbarkeit des Tests hat und zum anderen, ob die Resultate der überarbeiteten Methodik dadurch beeinflusst werden.

Unabhängig vom Bindemittel wurde bei den Versuchen mit der Farbe 1, bei der ein Eintrag der Konservierungsmittel ausschließlich über die Rohstoffe erfolgte, ein deutliches Wachstum von Bakterien nachgewiesen, welches bei den künstlich gealterten Proben schwächer ausfiel. Bei Mischung 1 waren lediglich bei der VA/E-haltigen Farbe Kolonien nachweisbar, bei der Dispersionsfarbe mit Reinacrylat als Bindemittel waren keine Bakterien nachweisbar (Abbildung 13).

Ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in Abhängigkeit vom Bindemittel war bei den Hefen zu verzeichnen. In der VA/E-haltigen Farbe waren die Hefen in der Lage, in der Farbe 1 zu wachsen. Wurde das Bindemittel durch Reinacrylat ersetzt, fand keine Vermehrung der Hefen mehr statt. Lediglich einzelne Kolonien waren hier nachweisbar. Das gleiche Ergebnis ergab sich für die künstlich gealterten Proben, wobei die Keimzahl in beiden Bindemittelsystemen insgesamt geringer ausfiel als bei den ungealterten Proben. Bei Mischung 1 bildeten sich bei der VA/E-haltigen Dispersionsfarbe in allen Proben Kolonien aus. Im Unterschied dazu konnte bei der Reinacrylat-haltigen Farbe nur bei 2 Proben der Mischung Kolonien gezeigt werden, bei den anderen Proben waren keine Hefen nachweisbar. Dieser Unterschied zwischen den einzelnen Proben spiegelt sich auch in der hohen Standardabweichung wider.

Bei den Schimmelpilzen wurden keinerlei Unterschiede bezüglich der Besiedelbarkeit der Farboberfläche in Abhängigkeit vom Bindemittel nachgewiesen.

Abbildung 13: Vergleich der Bindemittel mit ungealterten und künstlich gealterten Farben (kA)

	Bindemittel	Farbe 1		Farbe 3 (konserviert)		Mischung 1 (konserviert)	
			kA		kA		kA
Bakterien	VA/E	↑	↑	-	-	↓	-
	RA	↑	↑	-	-	-	-
Hefen	VA/E	↑	↑	-	-	↓	↓
	RA	↓	↓	-	-	(↓)	-
Schimmelpilze	VA/E	-	-	-	-	-	-
	RA	-	-	-	-	-	-

↑ : Wachstum  stark schwach
 ↓ : Nachweis von Kolonien

5.1.3 Weiße Innenraumdispersionsfarbe konserviert mit ZnP/BIT

Derzeit liegt die maximal mögliche Einbringmenge für MIT bei ≤100 ppm. Die Diskussion über die Neueinstufung von MIT könnte zu einer Beschränkung der einsetzbaren Konzentration im Rahmen der Blauen Engel Zulassung führen. Somit wäre die momentan meist verwendete Wirkstoffkombination zur Konservierung von Dispersionswandfarben (100 ppm MIT + 100 ppm BIT) nicht mehr zulässig. Aufgrund dessen wurde in dem Vorhaben eine Dispersionsfarbe mit Zinkpyrithion/BIT als alternative Konservierungsmittelkombination getestet. Hierbei wurden vier Farben mit einer unterschiedlichen Konzentration an BIT und ZnP getestet (Tabelle 2).

Direkt nach Erhalt der Farben wurden diese routinemäßig auf Nährmedium (Caso-Agar, siehe Material und Methoden) ausgestrichen und auf mögliche Kontaminationen überprüft.

Hierbei wurde in allen Proben ein deutliches Wachstum von Mikroorganismen nachgewiesen. Das Vorhandensein von Keimen in den Farben muss jedoch nicht zwingend zu einer Beeinflussung des Produktes führen. Handelt es sich zum Beispiel um Dauerstadien wie Bacillus-Sporen, ist von keiner Beeinträchtigung des Produktes auszugehen. Problematisch wird es erst, wenn die Mikroorganismen unter günstigen Bedingungen auskeimen und Stoffwechselaktivität zeigen. Die Farben wurden zur Kontrolle auf Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar ausgestrichen, um zu überprüfen, ob andere Mikroorganismen als Bacillus in den Proben vorliegen. Hierbei handelt es sich um ein Medium, das das Wachstum von Gram+ Bakterien, wie z.B. Bacillus, durch die Anwesenheit von Gallensalzen und Kristallviolett inhibiert. Auch bei diesem Medium konnte das Wachstum von Mikroorganismen beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass neben Bacillus noch andere Bakterien in den Farben vorlagen. Vereinzelt konnten auch Schimmelpilze nachgewiesen werden.

Durch die bisherige Kombination aus MIT und BIT werden vorliegende Keime in den Farben meist zuverlässig vor Abfüllung in das Gebinde abgetötet. Bei einer milderen Konservierungsmittelkombination, wie z.B. BIT/ZnP, kann das Vorhandensein von Mikroorganismen jedoch problematisch sein. Nach Rücksprache mit dem Farbhersteller wurde beschlossen, eine Farbe herzustellen, bei der werkseitig eine zusätzliche Desinfektion des Produktes vorgenommen wird. Auf diesem Wege sollte der größtmögliche Teil der Bakterien in der Dispersionsfarbe vor der Abfüllung eliminiert werden, um einen Langzeitschutz der milden Konservierung im Gebinde zu gewährleisten.

Es wurde sich darauf geeinigt, dieses „sterile“ Muster zu testen, um die Wirksamkeit des Biozidsystems zu prüfen. Hierbei bleibt zu berücksichtigen, dass sich eine Farbe, die mit einem Keimeintrag produziert wird, gegenüber einem „sterilen“ Muster vermutlich anders verhält. Abhängig von dem Zeitraum, den die Keime in der Farbe verbleiben können, setzt dort bereits Stoffwechsel ein, was in einer höheren Anfälligkeit resultieren kann. Nach Anlieferung der neuen Farben wurden diese zur Überprüfung auf vorhandene vermehrungsfähige Mikroorganismen untersucht. In keiner der vier Proben wurde ein Wachstum beobachtet, so dass diese Farben für den Belastungstest mit Bakterien eingesetzt wurden.

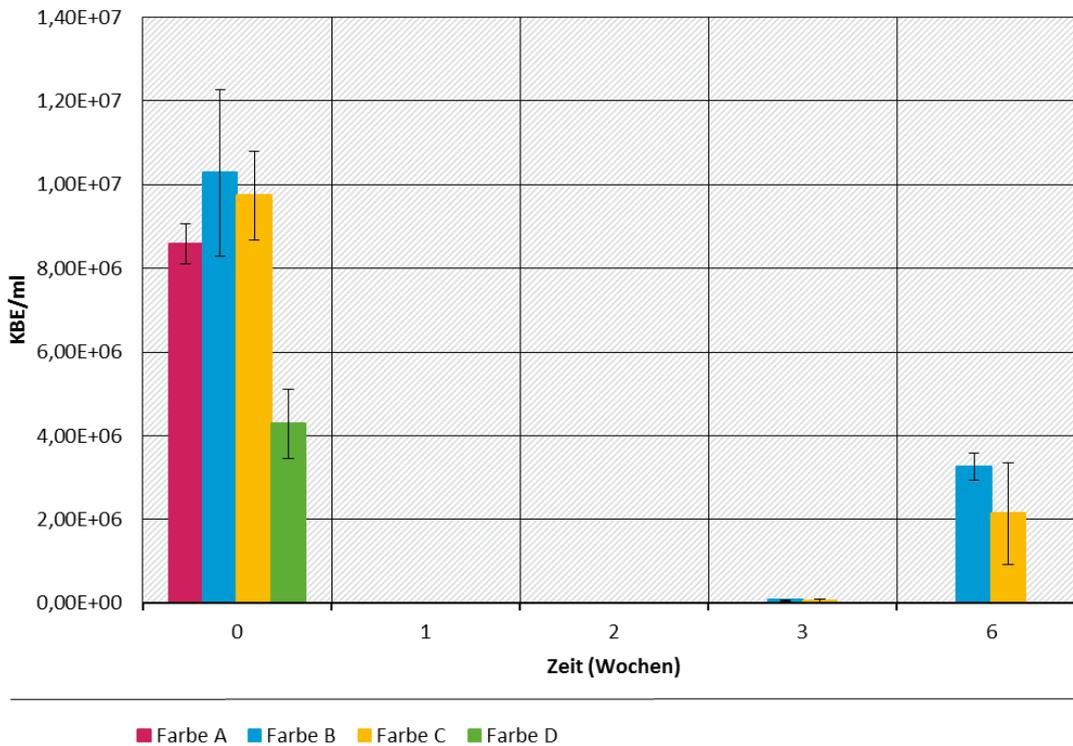
5.1.3.1 Bakterien

Für den Belastungstest wurden die Farbproben in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Bakteriensuspension beimpft, welche die Prüforganismen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ KBE/ml enthielt. Anschließend wurden die Proben bei 30 ± 2 °C gelagert und die Zellzahl über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt. Die Farben unterschieden sich dabei in der Konzentration der eingesetzten Konservierungsmittelkombination aus BIT und ZnP. Farbe B enthielt jeweils 50 ppm BIT und ZnP, Farbe C 100 ppm BIT und 50 ppm ZnP und Farbe C enthielt ZnP und BIT jeweils zu 100 ppm. Als Kontrolle diente die unkonservierte Farbe A. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14: Belastungstest mit Bakterien in SA-haltiger Farbe

Bestimmung der koloniebildenden Einheit

Bindemittel Styrolacrylat



Quelle: BAM

Wie Abbildung 14 zu entnehmen ist, fand bei der unkonservierten Probe (Farbe A) über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen weder ein Wachstum von Bakterien noch eine Koloniebildung statt. Bei den konservierten Farben B und C hingegen wurde nach drei Wochen die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Nach sechs Wochen war die Zellzahl in diesen Proben weiterhin gestiegen. Die Probe mit der stärksten Konservierung (100 ppm BIT und 100 ppm ZnP) zeigte zu keinem Zeitpunkt ein bakterielles Wachstum oder die Ausbildung von Kolonien. Eine parallele Untersuchung der Farben durch den Konservierungsmittelhersteller lieferte das gleiche Ergebnis (persönliche Mitteilung durch den Farbhersteller). Die Tatsache, dass bei der unkonservierten Probe kein Wachstum der Bakterien oder Koloniebildung nachgewiesen wurde, lässt sich vermutlich durch die zusätzlich vorgenommene Desinfektion der Farbe erklären. Möglicherweise befanden sich noch Produkte des Desinfektionsmittels in der Farbe, die einen Einfluss auf die Anfälligkeit der Farbe gegenüber Mikroorganismen hatten.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an BIT vor dem Versuch und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 32). Eine aussagekräftige Bestimmung des Gehaltes an ZnP durch UHPLC war nicht möglich. Die theoretischen Ausgangswerte an Zinkpyrithion lagen bei jeweils 50 ppm für Farbe B und Farbe C und bei 100 ppm für Farbe D. Der Gehalt an BIT in den Farben ist in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: BIT-Gehalt in SA-haltiger Farbe nach Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	n.n.	0,199 ± 0,19	0,35 ± 0,27
B	49	35,47 ± 0,51	42,26 ± 0,72
C	103	87,15 ± 1,74	84,08 ± 2,18
D	100	91,19 ± 1,03	88,59 ± 1,09

n.n. nicht nachgewiesen. Die Bestimmung der BIT-Ausgangswerte erfolgte durch den Konservierungsmittelhersteller.

Wie aus Tabelle 32 ersichtlich ist, wurde nach Abschluss des Belastungstests bei den meisten Farben keine Veränderung des Biozidgehalts in Abhängigkeit von der Belastung durch Bakterien nachgewiesen. Lediglich bei Farbe B (50ppm BIT und 50ppm ZnP) war eine Beeinflussung gegeben.

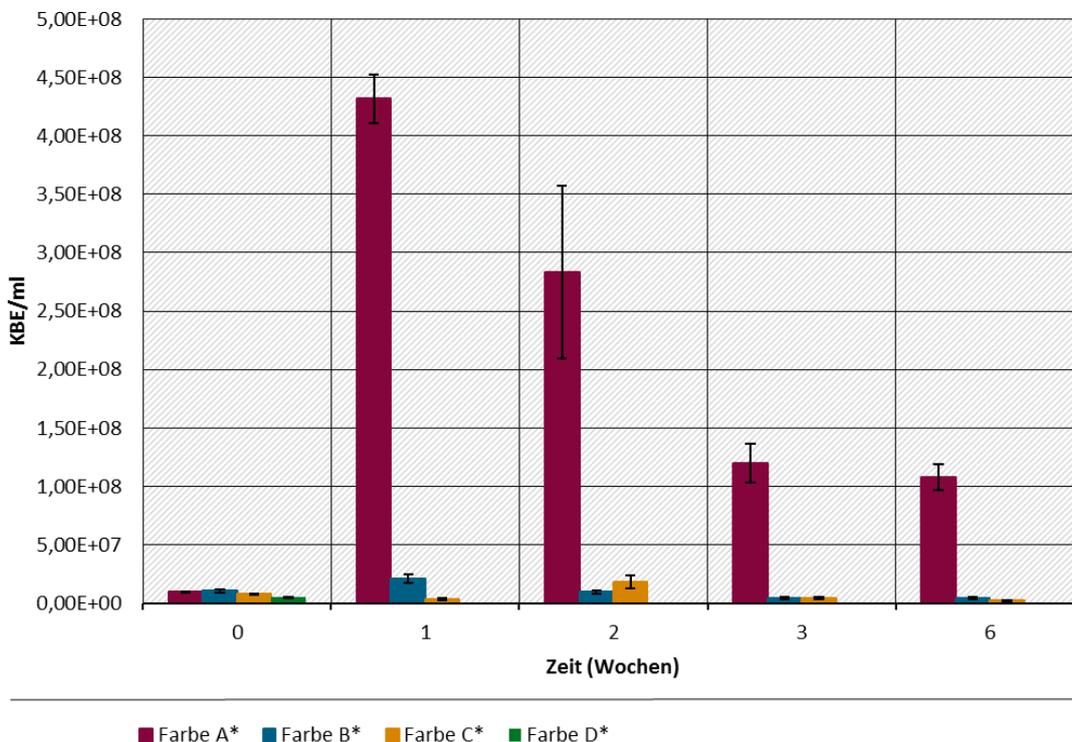
Künstliche Alterung

Alle vier Farbproben wurden einer künstlichen Alterung unterzogen und anschließend im Belastungstest hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bakterien untersucht (siehe Abbildung 15).

Abbildung 15: Belastungstest mit Bakterien in SA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung

Bindemittel Sytrolacrylat



Quelle: BAM

Bei der unkonservierten Farbe A wurde bereits nach einer Woche Inkubation der Proben ein deutliches Wachstum der Bakterien beobachtet. Ab der zweiten Woche nahm die Zellzahl in dieser Farbe kontinuierlich ab.

Farbe B zeigte nach einer Woche ebenfalls ein bakterielles Wachstum; anschließend nahm auch hier die Zellzahl ab und es wurden lediglich Kolonien nachgewiesen. Bei Farbe C wurden nach einem Zeitraum von einer Woche Kolonien nachgewiesen, nach zwei Wochen wurde eine leichte Zunahme in der Zellzahl beobachtet. Die Zellzahl lag jedoch zu jedem Zeitpunkt unterhalb des Inokulums. Die Farbe mit der stärksten Konservierung (Farbe D) zeigte über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen kein bakterielles Wachstum oder das Auftreten von Kolonien und war somit ausreichend gegenüber Bakterien geschützt. Verglichen mit den ungealterten Farben wurde in diesem Versuch insgesamt eine höhere Empfindlichkeit der Farben gegenüber Bakterien beobachtet.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an BIT vor Versuchsbeginn, nach der künstlichen Alterung und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 33).

Tabelle 33: BIT-Gehalt in SA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Farbe	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,26 ± 0,006	0,61 ± 0,18	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B	43,64 ± 0,24	42,07 ± 0,80	31,46 ± 0,47	42,18 ± 0,51
C	85,94 ± 0,63	85,07 ± 1,09	72,38 ± 3,43	89,01 ± 7,25
D	86,83 ± 0,26	84,99 ± 3,27	88,58 ± 3,97	88,10 ± 7,71

Nach der Alterung wurde in keiner der Proben eine Abnahme im BIT-Gehalt nachgewiesen. Bei den Farben B und C, mit einer Konservierungsmittelkombination aus 50ppm BIT und 50ppm ZnP (Farbe B) bzw. 100ppm BIT und 50ppm ZnP (Farbe C) wurde eine Abnahme an BIT in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Bakterien gemessen. Farbe D (100ppm BIT und 100ppm ZnP) zeigte keine Beeinflussung des BIT-Gehalts durch Bakterien.

5.1.4 Bodenbelagsklebstoffe

Bislang wird zwischen den verschiedenen Innenraumbauprodukten bezüglich der Anforderungen an die Topfkonservierung keine Unterscheidung vorgenommen. Im Rahmen des Vorhabens wurde überprüft, ob der Gebrauchstauglichkeitstest in seiner revidierten Fassung auch auf andere Innenraumbauprodukte anwendbar ist. Da sich die verschiedenen Materialien in ihren Eigenschaften, wie z.B. in der Konsistenz, stark unterscheiden, erscheint dies fraglich. Der Test wurde mit einem ungealterten und einem künstlich gealterten Dispersionsklebstoff durchgeführt. In Anlehnung an die vorherigen Untersuchungen wurde der Klebstoff mit einer Konservierungsmittelkombination von MIT und BIT (jeweils 100ppm) versehen. Durch Mischen des konservierten Klebstoffs A und unkonservierten Klebstoffs B im Verhältnis 1:1 wurde zudem eine Probe mit einer mittleren Biozidkonzentration für die Untersuchungen herangezogen. Wie zuvor bei den Dispersionsfarben beschrieben, wurden Bakterien, Hefe- und Schimmelpilze im Testverfahren berücksichtigt.

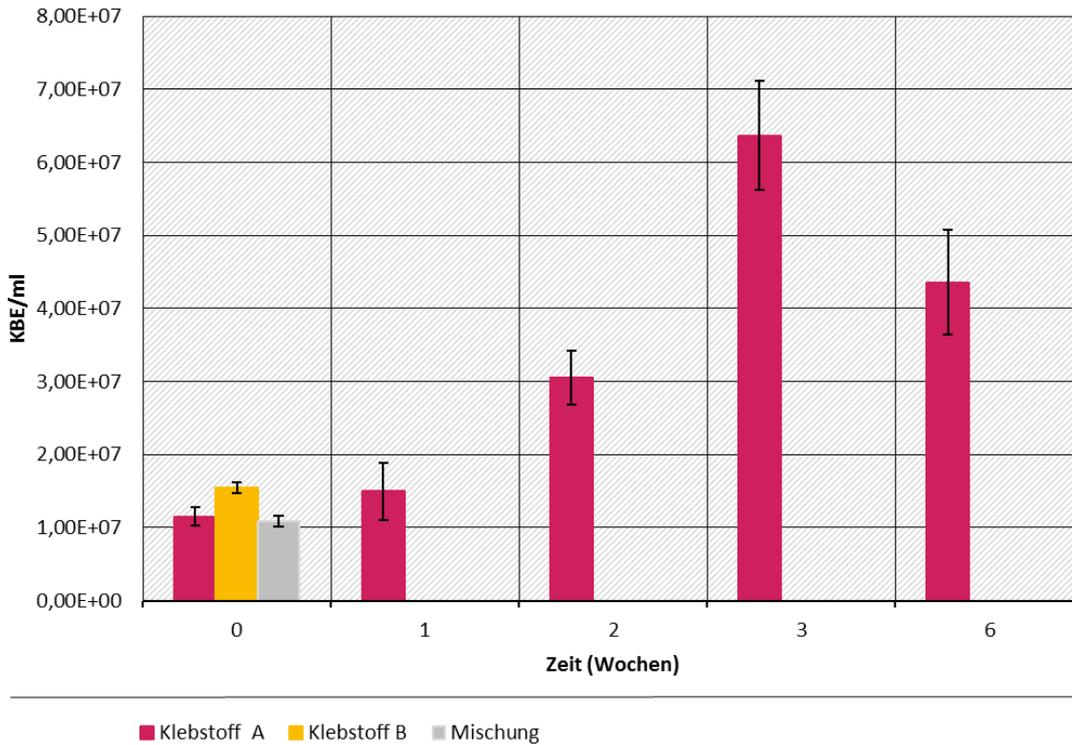
5.1.4.1 Bakterien

Für die Durchführung des Testverfahrens kamen andere Bakterien als bei den Innenraumwandfarben zum Einsatz. In Anlehnung an eine Methode für polymere Dispersionen der „International Biodeterioration Research Group“ (Methode IBRG PDG16-001.2 siehe <http://www.ibrg.org/methods>) wurden folgende Bakterien für den Gebrauchstauglichkeitstest ausgewählt: *A. hydrophila*, *A. faecalis*, *P. rettgeri*,

P. aeruginosa und *S. marcescens* (Tabelle 3). Für den Belastungstest wurden die Klebstoffproben wöchentlich 1%-ig mit einer Bakteriensuspension beimpft, die die Prüforganismen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ KBE/ml enthielt. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt.

Abbildung 16: Belastungstest von Klebstoffen mit Bakterien

Bestimmung der koloniebildenden Einheit



Quelle: BAM

Die Lebendzellzahl wurde nach jeder der drei Beimpfungen und nach Abschluss des Tests durch Bestimmung der KBE/ml ermittelt. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, wurde über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen nur bei dem unkonservierten Klebstoff A ein bakterielles Wachstum beobachtet. Bei der Mischung und dem konservierten Klebstoff B waren nur direkt nach der Beimpfung (Woche 0) Bakterien nachweisbar, aber zu keinem späteren Zeitpunkt.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor Versuchsbeginn und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 34 und 35).

Tabelle 34: MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Bakterien

MIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,85 ± 0,05	0,56 ± 0,07	1,149 ± 0,09
B	93,40 ± 0,53	86,65 ± 4,97	84,68 ± 11,25
Mischung	36,53 ± 1,96	49,98 ± 6,84	42,18 ± 1,38

Tabelle 35: BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,26 ± 0,014	2,05 ± 2,02	1,628 ± 0,33
B	48,09 ± 1,76	56,60 ± 4,31	52,68 ± 4,82
Mischung	15,06 ± 2,42	28,59 ± 4,85	20,16 ± 3,61

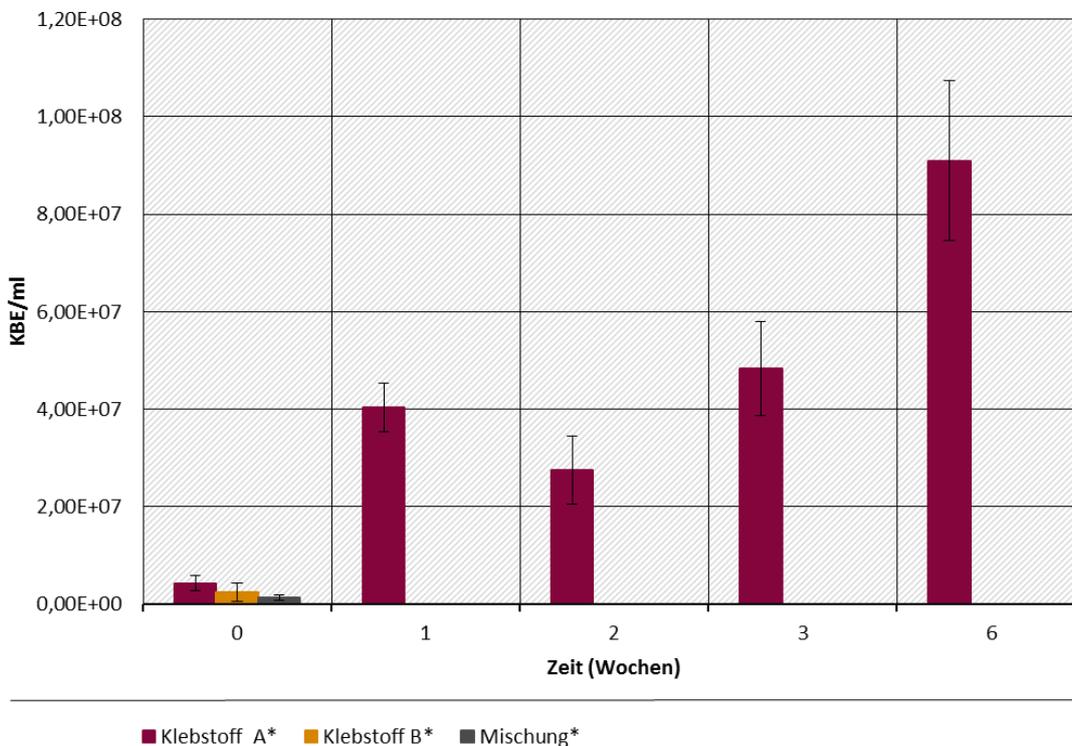
Die Anwesenheit von Bakterien hatte keinen Einfluss auf den Konservierungsmittelgehalt. Die Mischung war auch nach sechs Wochen Belastungstest mit einem MIT-Gehalt von 50 ppm und einem BIT-Gehalt von 29 ppm ausreichend konserviert, um alle Bakterien abzutöten.

Künstliche Alterung

Alle Klebstoffproben wurden einer künstlichen Alterung unterzogen und anschließend im Belastungstest hinsichtlich ihrer Besiedelbarkeit durch Bakterien untersucht. Wie anhand Abbildung 17 zu erkennen ist, wurden auch nach der künstlichen Alterung keine Bakterien in der Mischung und im konservierten Klebstoff B nachgewiesen. Bei der unkonservierten Klebstoffprobe A war nach der Alterung ein deutliches Wachstum der Bakterien zu erkennen, welches verglichen mit der ungealterten Probe etwas stärker ausfiel.

Abbildung 17: Belastungstest von Klebstoffen mit Bakterien nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung



Quelle: BAM

Analyse der Biozidkonzentration nach der künstlichen Alterung

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor und nach der künstlichen Alterung sowie nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 36 und 37).

Tabelle 36: MIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,72 ± 0,02	1,32 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,95 ± 0,19
B	88,10 ± 1,34	61,64 ± 1,32	51,82 ± 1,45	57,92 ± 1,37
Mischung	45,19 ± 0,36	31,08 ± 0,72	27,67 ± 1,09	34,23 ± 2,43

Tabelle 37: BIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Bakterien

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,69 ± 0,09	2,29 ± 1,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B	59,24 ± 0,33	76,06 ± 4,56	13,23 ± 2,03	10,86 ± 1,37
Mischung	28,73 ± 0,42	24,62 ± 4,16	4,45 ± 0,29	3,19 ± 0,32

Nach der künstlichen Alterung wurde bei Klebstoff B und der Mischung eine deutliche Abnahme im MIT Gehalt verzeichnet. Die vorhandene Konzentration war jedoch ausreichend, um ein bakterielles Wachstum in diesen Proben zu verhindern. Die Anwesenheit der Bakterien hatte keinen wesentlichen Einfluss auf den Konservierungsmittelgehalt.

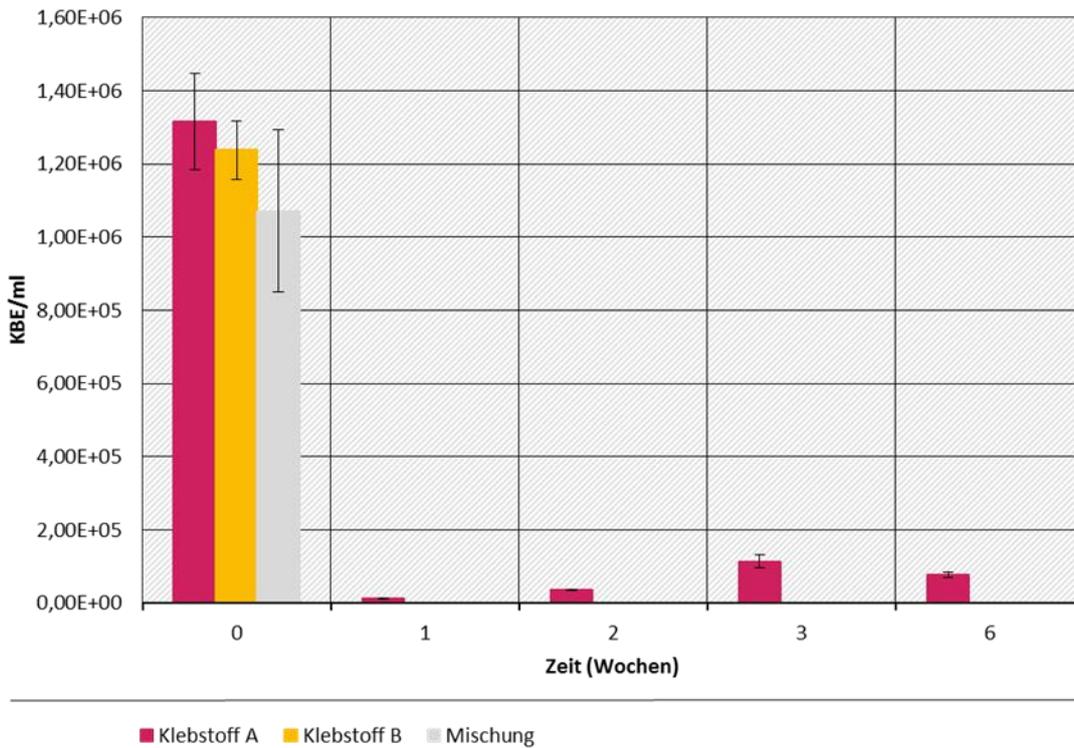
5.1.4.2 Hefen

Der Belastungstest wurde auch unter Verwendung von Hefen durchgeführt (Tabelle 4). Orientierend an der IBRG-Methode IBRG PDG16-001.2 wurden die Hefestämme *S. cerevisiae* und *R. mucilaginosa* verwendet. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde weder ein Wachstum noch die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Da auch in dem unkonservierten Klebstoff kein Wachstum der Hefen erfolgte, wurde entschieden, den Test mit zwei Vertretern der Gattung *Candida* zu wiederholen: *C. lipolytica* und *C. valida*.

Die Klebstoffproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Hefesuspension angeimpft und folgend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 1 * 10⁸ KBE/ml. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach jeder Inokulation und nach Abschluss des Versuchs. Das Ergebnis des Belastungstests ist in Abbildung 18 dargestellt.

Abbildung 18: Belastungstest von Klebstoffen mit Hefen

Bestimmung der koloniebildenden Einheit



Quelle: BAM

Bei Durchführung des Belastungstests wurden lediglich bei dem unkonservierten Dispersionsklebstoff A Kolonien nachgewiesen. Ein Wachstum der Hefen lag zu keinem Zeitpunkt vor; die Zellzahl lag immer unterhalb der Inokulumstärke (maximaler Wert nach drei Wochen: $1,15 \cdot 10^5$ KBE/ml). Bei dem konservierten Klebstoff B und der Mischung wurden über den gesamten Versuchszeitraum weder Kolonien noch Wachstum von Hefen beobachtet.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 38 und 39).

Tabelle 38: MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen

MIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	1,69 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,04
B	105,17 ± 6,98	86,73 ± 2,66	87,74 ± 2,73
Mischung	46,43 ± 5,48	39,43 ± 2,81	39,25 ± 1,59

Tabelle 39: BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen

BIT	Ausgangswert	nach Belastungs- test	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	1,30 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B	46,65 ± 3,53	24,40 ± 1,68	19,64 ± 0,87
Mischung	19,68 ± 1,86	8,29 ± 0,47	4,50 ± 1,19

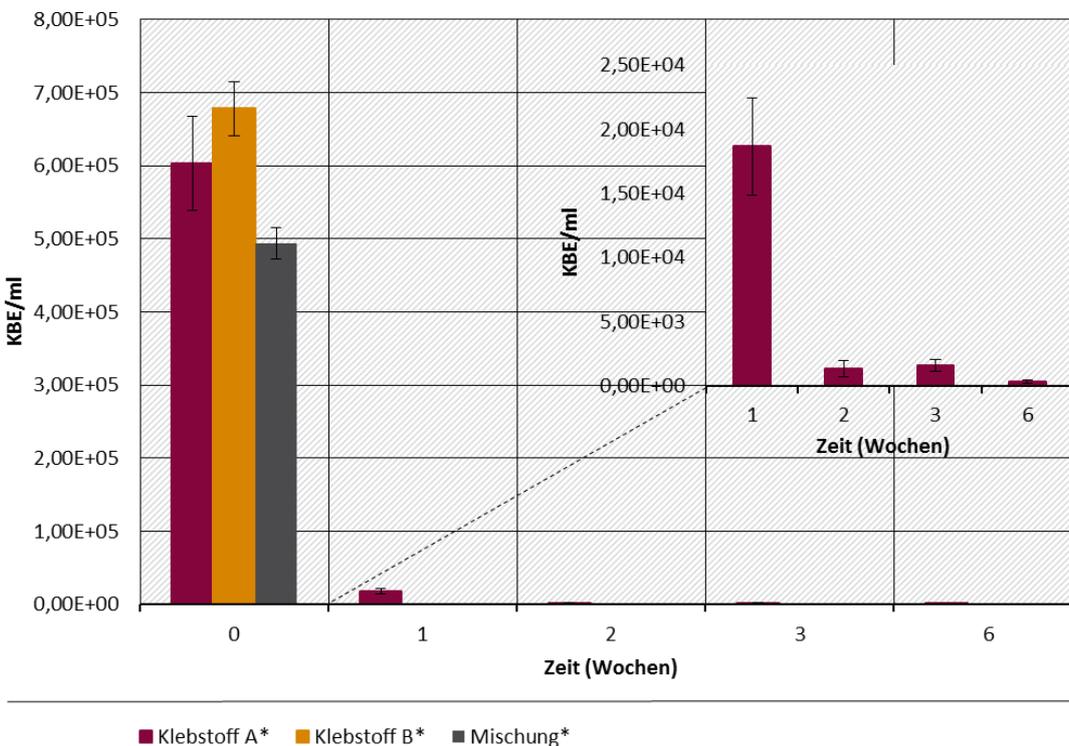
Nach Abschluss des Belastungstests wurde beim Klebstoff B unabhängig vom Vorhandensein der Hefen eine Abnahme an MIT und BIT nachgewiesen. Bei der Mischung war eine deutliche Abnahme im BIT Gehalt zu beobachten. Die Tatsache, dass in beiden Proben keine Hefen nachgewiesen wurden, lässt vermuten, dass das Produkt auch in den geringen Konservierungsmittelmengen noch effektiv gegenüber Hefen geschützt ist.

Künstliche Alterung

Nach Inkubation der Klebstoffe für 4 Wochen bei 40 °C wurden die Proben für den Belastungstest eingesetzt und hinsichtlich der Besiedelbarkeit durch Hefen untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt.

Abbildung 19: Belastungstest von Klebstoffen mit Hefen nach künstlicher Alterung (*)

Bestimmung der koloniebildenden Einheit nach Alterung



Quelle: BAM

Bei keiner Probe wurde nach der künstlichen Alterung ein Wachstum der Hefen beobachtet. Lediglich beim unkonservierten Klebstoff A wurden Kolonien nachgewiesen. Die Zellzahl nahm über den Versuchszeitraum trotz wiederkehrender Beimpfung ab und lag nach sechs Wochen bei $3,55 \cdot 10^2$ KBE/ml.

Analyse der Biozidkonzentration nach der künstlichen Alterung

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor und nach der künstlichen Alterung sowie nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 40 und 41).

Tabelle 40: MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen nach künstlicher Alterung

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,081 ± 0,00	0,6 ± 0,05	0,00 ± 0,00	1,25 ± 0,06
B	88,67 ± 5,78	73,27 ± 2,65	61,03 ± 5,69	72,66 ± 4,77
Mischung	42,19 ± 1,00	35,86 ± 1,59	26,26 ± 3,16	35,02 ± 2,22

Tabelle 41: BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Hefen nach künstlicher Alterung

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B	33,01 ± 2,92	17,77 ± 1,40	26,58 ± 1,85	17,53 ± 1,30
Mischung	14,15 ± 0,88	6,83 ± 0,27	9,84 ± 1,15	5,80 ± 0,20

Nach der künstlichen Alterung wurde eine Abnahme im Konservierungsmittelgehalt gemessen. Die Konzentration an Konservierungsmittel war jedoch ausreichend, um alle Hefen abzutöten bzw. ein Wachstum zu verhindern.

5.1.4.3 Schimmelpilze

Die Dispersionsklebstoffe wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Sporensuspension von *Geotrichum candidum* inokuliert. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 1×10^6 Sporen/ml eingestellt und durch vorsichtiges Schwenken der Probe gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Anschließend wurden die Proben bei 30 ± 2 °C gelagert. Nach jedem Inokulationsschritt und nach Abschluss des Belastungstests erfolgte eine visuelle Auswertung. Die Versuche wurden mit ungealterten und mit künstlich gealterten Proben durchgeführt. Zu keinem Zeitpunkt wurde in den Proben ein Wachstum von Schimmelpilzen beobachtet.

Analyse der Biozidkonzentration

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor dem Versuch und nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 42 und 43).

Tabelle 42: MIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

MIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	1,21 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,14 ± 0,03
B	101,83 ± 2,05	84,37 ± 2,98	85,51 ± 1,59
Mischung	51,21 ± 2,16	44,97 ± 1,88	42,98 ± 2,91

Tabelle 43: BIT-Gehalt in Klebstoffen nach Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

BIT	Ausgangswert	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,32 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B	45,57 ± 2,02	27,42 ± 1,02	24,89 ± 1,44
Mischung	22,94 ± 0,75	12,97 ± 1,19	9,09 ± 1,73

Nach Durchführung des Belastungstests wurde bei dem Dispersionsklebstoff B und der Mischung eine deutliche Abnahme des MIT und BIT Gehalts nachgewiesen. Ein Einfluss des Pilzes auf die Konzentration lag dabei nicht vor.

Analyse der Biozidkonzentration nach der künstlichen Alterung

Von allen Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT vor und nach der künstlichen Alterung sowie nach Abschluss des Belastungstests bestimmt (Tabelle 44 und 45).

Tabelle 44: MIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

MIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	1,21 ± 0,04	1,04 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,53 ± 0,04
B	101,83 ± 2,1	70,40 ± 0,37	64,91 ± 3,06	65,74 ± 0,90
Mischung	51,21 ± 2,2	34,10 ± 0,90	28,94 ± 1,78	29,71 ± 1,21

Tabelle 45: BIT-Gehalt in Klebstoffen nach künstlicher Alterung und Belastungstest mit Schimmelpilzsporen

BIT	Ausgangswert	nach Alterung	nach Belastungstest	Kontrollen (unbeimpft)
Klebstoff	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]	Gehalt [mg/kg]
A	0,32 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B	45,57 ± 2,02	19,84 ± 0,66	12,40 ± 0,51	10,27 ± 0,17
Mischung	22,94 ± 0,75	8,93 ± 0,60	4,83 ± 0,40	4,27 ± 0,42

Nach Ablauf der künstlichen Alterung wurde eine deutliche Abnahme an MIT und BIT im Dispersionsklebstoff B und der Mischung nachgewiesen. Die Durchführung des Belastungstests mit Schimmelpilzsporen hatte keinen Einfluss auf den Gehalt der Konservierungsmittel.

5.2 Klärung der Notwendigkeit und des Ziels einer chemischen Topfkonservierung unter Berücksichtigung der Betriebshygiene

Im Rahmen des Forschungsvorhabens erfolgte die Besichtigung von vier Produktionsanlagen für Dispersionsfarben. Bei allen vier Farbwerken handelt es sich um Produzenten von weißen Innenraumwandfarben, die mit dem Umweltzeichen „Blauer Engel“ ausgezeichnet sind. Alle im Weiteren gemachten Angaben sind von Firmenmitarbeitern mündlich übermittelt worden und wurden nicht überprüft.

In allen Werken wurden die Topfkonservierer MIT/BIT bis zu 200 ppm eingesetzt (Wirkstoffkombination b gemäß dem Anhang 1 zur Vergabegrundlage RAL-UZ 102, Ausgabe Januar 2015). Wässrig gelöste Rohstoffe und Zwischenprodukte waren ebenfalls durch Biozide vor Verderb geschützt. Diese wurden bei Berechnung des maximal möglichen Einsatzes an MIT/BIT berücksichtigt. In allen besichtigten Werken gab es Pläne zur regelmäßigen Prüfung der Werkshygiene. Hierzu wurden Proben an verschiedenen produktionsrelevanten Stellen entnommen. In zwei Werken gab es ein mikrobiologisches Labor, in dem die Proben direkt nach der Entnahme bezüglich ihres Keimgehaltes überprüft wurden. Zwei weitere Werke verschickten die entnommenen Proben an den Biozidhersteller zur Bestimmung der Keimzahlen. Die Keimgehalte werden i.d.R. semi-quantitativ bestimmt. In drei Werken dauerte es 3-4 Tage bis das Ergebnis der Überwachung bereitstand. In dem vierten Werk wurde durch Fluoreszenzmessungen der Keimgehalt zügiger bestimmt. In allen Werken war man sich des Einflusses der Rohstoffe und der Werkshygiene auf die Keimgehalte im Endprodukt bewusst. Beim Einkauf der Rohstoffe werden von den Lieferanten saubere Rohstoffe gefordert. Der Rohstofflieferant muss daher seinerseits Maßnahmen ergreifen, um dies zu gewährleisten. Hierzu gehört z.B. das Einfordern von Reinigungszertifikaten der Tanks bei den Transportfirmen. Die Reinigung der Schläuche bei Anlieferung der Rohstoffe ins Farbwerk obliegt hingegen i.d.R. den Farbwerken.

Bei Eingang der Rohstoffe werden Proben gezogen und bezüglich des Keimgehaltes untersucht. In drei der Werke geschieht dies im eigenen Haus. In drei Werken wurden bei erkennbar hohen Keimzahlen in der Produktion schnell abbaubare Biozide eingesetzt, die bei der Abfüllung des Produkts in das Gebinde bereits abgebaut sein sollten (z.B. CIT, DBNPA). In einem Werk wurde der Einsatz der „cleaning in place (CIP)“-Methode als nicht geeignet benannt, da hierdurch die chemische Ausgewogenheit der Farbe beeinträchtigt würde. Zur Beurteilung des mikrobiologischen Problems gab es in zwei Werken jeweils mikrobiologisch ausgebildetes Personal, das den Bewuchs nicht nur quantitativ, sondern, nach Bedarf, auch qualitativ bewertet hat. Das dritte Werk erfasste die Werte rein quantitativ und erfragte bei Keimzahlen über 100 je Ausstrichplatte Hilfe beim Biozidlieferanten. Im vierten der besuchten Werke wurde die gesamte biologische Überwachung durch den Biozidlieferanten erbracht. Hygieneaudits wurden in zwei der Werke selbstständig mit mikrobiologisch ausgebildetem Personal durchgeführt. Der Biozidlieferant wurde aber bei nicht selbstständig im Werk lösbaren Hygieneproblemen herangezogen. In den beiden anderen Werken wurden auch die Hygieneaudits durch den Biozidlieferanten erbracht. Dies zeigt die enge Verknüpfung der Werke zu ihren Biozidlieferanten.

Dies ist auch darin begründet, dass die Biozidlieferanten die Überprüfungen und Hilfeleistungen in allen Werken als unentgeltlichen Service anbieten. In drei Werken wurde Trinkwasser zur Produktion eingesetzt, im vierten Werk kam desinfiziertes, oberflächen-nahes Drainagewasser für die Produktion zum Einsatz. In einem Werk wurde zusätzlich eine UV-Bestrahlung zur Trinkwasserreinigung durchgeführt. Beim Bau neuer Anlagen wurde bereits in den letzten Jahren auf eine möglichst gradlinige und verzweigungsfreie Zufuhr der Stoffe in der Produktion geachtet. Freie Leitungen werden mit sog. Molchen mechanisch gereinigt. Weitere Reinigungsschritte werden chemisch durchgeführt (z.B. H₂O₂). Mikrobiell kontaminierte Rohstoffe oder Zwischenprodukte werden z.B. mit CIT oder DBNPA gereinigt.

Die Farbhersteller machten zu den Rahmenbedingungen der Topfkonservierung folgende Aussagen:

- a) Baumärkte fordern eine Haltbarkeit von weißer Innenraumwandfarbe in Gebinden von 2-3 Jahren
- b) Baumärkte sind nicht bereit, die Regale nach dem „First-in, first-out“-Prinzip zu bestücken. Teilweise lassen Farbhersteller Regalpflege im Baumarkt durch eigenes Personal ausführen
- c) Verbraucher erwarten eine Haltbarkeit von ca. 6 Monaten nach Öffnung des Gebindes und Gebrauch der Farbe
- d) Produkte ohne Blauen Engel sind nicht absetzbar oder nur zu sehr niedrigen Preisen
- e) Ein Mindesthaltbarkeitsdatum führt zu Verlusten, da Farben danach nicht mehr absetzbar sind

Problematisch erweist sich, dass ein reduzierter Biozideinsatz (≤ 200 ppm MIT/BIT, Verhältnis 50:50) die Lagerstabilität der Farbe im Gebinde reduzieren kann. Neben der Optimierung der Werkshygiene gibt es die Möglichkeit, die Farbe zeitnah zur Produktion zu verbrauchen.

Lösungsansätze:

Es muss das Gespräch mit den Baumärkten gesucht werden. Die Baumärkte müssen sich dem „First-in, first-out“-Prinzip verpflichtet fühlen. Alternativ kann die Regal- und Produktpflege von den Farbwerken bezüglich Ihrer eigenen Produkte in den Baumärkten selbst betrieben werden. Eines der besuchten Werke bestückt seine Regale bereits durch eigenes Personal. Mindesthaltbarkeitsdaten müssen dem Verbraucher signalisieren, dass Farbe mit Blauer Engel Auszeichnung „frisch“ verbraucht werden sollte. Farben, die für eine längere Lagerung bis zu 2 Jahren vorgesehen sind, können weiterhin vermarktet werden, ohne das Umweltzeichen des Blauen Engel zu tragen. Dem Verbraucher muss durch Werbung etc. verständlich gemacht werden, dass frisch zu verbrauchende Farben weniger Biozide enthalten; dem Verbraucher wird hierdurch eine Wahl gegeben.

5.3 Konservierung von Pigmentpasten

Laut des Marktforschungsinstituts Ceresana liegt die weltweite Nachfrage nach Pigmenten bei fast 9,7 Millionen Tonnen (report 4. Auflage). Den bedeutendsten Absatzmarkt stellte 2014 die Herstellung von Farben und Lacken mit über 45 % des globalen Gesamtverbrauchs dar.

Laut Studie wird für den weltweiten Pigmentmarkt ein Umsatz von über 45 Mrd. USD im Jahr 2018 erwartet. Im westeuropäischen Raum liegt der Umsatz für Pigmente im Jahr 2018 voraussichtlich bei 5,52 Mrd. EUR, wobei Deutschland den größten Teil an Pigmentverbrauch hat (Farben und Lack, 118. Jahrgang, H2795; Jahr 2012). In den letzten Jahren wurde bei der Innenraumgestaltung ein Trend in Richtung farbige Wandfarben beobachtet. Pigmentpasten, die zur Abtönung weißer Wandfarben und Basiswandfarben genutzt werden, sind je nach organischen und anorganischen Anteilen unterschiedlich anfällig für mikrobiologischen Bewuchs. Organische Pigmente haben ein geringeres Deckungsvermögen, sind aber farbstärker und brillanter als anorganische Pigmente. Pigmentpasten, die im Werk genutzt werden, müssen aufgrund ihres schnelleren Durchsatzes und der besseren Pflege des Dosiergerätes weniger stark konserviert werden als Pigmentpasten im kundennahen Bereich, wie z.B. im Baumarkt. Die Konservierung von Pigmentpasten ist um ein Vielfaches höher als die Konservierung weißer Innenwandfarben. Im verbrauchernahen Bereich folgt daraus, dass die Grenzwerte an Bioziden für die Vergabe des Umweltzeichens „Blauer Engel“ durch die Zugabe einer Pigmentpaste überschritten werden können. Wird die Wandfarbe bereits koloriert aus dem Farbwerk geliefert, können

die Grenzwerte jedoch eingehalten werden und kolorierte Farbe kann mit Umweltzeichen an den Kunden verkauft werden. Da nicht jeder Farbton, wie er zurzeit im verbrauchernahen Bereich durch Anmischen der Farbe vor Ort erreicht und vorrätig produziert werden kann, gibt es den Service einer der besuchten Farbhersteller, einen Farbton gezielt nach Kundenwunsch im Werk herzustellen, und an den Baumarkt auszuliefern, der den Kundenwunsch als Auftrag entgegengenommen hat. Dieser Service wird bereits ab einem 5 Litergebinde angeboten. Ob diese so im Werk hergestellte kolorierte Farbe die Grenzwerte des Blauen-Engel einhalten kann, hängt von dem Farbpigment und der gewünschten Farbintensität ab. Bis zur Auslieferung der Farbe an den bestellenden Baumarkt können 2-3 Tage vergehen. Nachteil hierbei sind die anfallenden Transportwege und die eingeschränkte Spontaneität des Kunden; Vorteil ist der verringerte Biozideinsatz, wenn das Pigment im Werk eingerührt wird. Die Konservierung von Pigmentpasten in *point-of-sale* (POS) Anlagen im verbrauchnahen Bereich stellt eine zusätzliche Herausforderung dar.

Deutschlandweit stehen circa 25 000 Dosieranlagen im Handel zur Verfügung. Die Abtönmaschinen bestehen in der Regel aus mehreren Kartuschen, in denen zwischen 16 und 32 verschiedene Pasten enthalten sind. Bei den Anlagen handelt es sich um halb offene Systeme, bei denen die Kanister aufgefüllt werden, ohne vorher vollständig geleert und gereinigt zu werden. Laut Literatur (Alexander, 2015) übersteigen die Kosten für das Ersetzen einer Pigmentpaste und die Reinigung eines mikrobiell kontaminierten Systems bei weitem die Kosten für einen zusätzlichen Einsatz an Bioziden (im Falle einer Kontamination). Die Pigmentpasten in den Anlagen werden in Intervallen gerührt, wodurch es regelmäßig zu einer Zufuhr von Sauerstoff kommt. Die optimalen Temperaturbedingungen liegen bei Pigmentpasten zwischen 15 und 35 °C und bilden somit ideale Bedingungen für das Wachstum von Mikroorganismen, insbesondere Schimmelpilzen. Die Pasten werden je nach Nachfrage und Abtöngrad zu den Wandfarben gegeben, was in einem unterschiedlichen Füllstand innerhalb der Kanister resultiert. Die Farbreste bilden halbtrockene und trockene Filme an den Gefäßwänden und erhöhen zusammen mit den feuchten Bedingungen, die zur Bildung von Kondenswasser an den Wänden und Deckeln der Kanister führen, die Wahrscheinlichkeit der Schimmelbildung. Zudem stehen einige Pigmentpasten (z.B. Magenta), die nur einen geringen Absatz haben, zum Teil länger als 1-2 Jahre in der Anlage. Der Befall durch Bakterien und Hefen ist meist schwerer zu erkennen als die Schimmelbildung an der Oberfläche, kann aber zu einer Veränderung des Farbtons, Geruchsbildung oder Gasbildung führen. Des Weiteren kann es zu einem Absetzen von Pigmenten und zu Veränderungen in der Viskosität kommen. Im Rahmen des Forschungsvorhabens fand im April 2017 ein Treffen mit den Herstellern von Abtönmaschinen statt. Bei dieser Veranstaltung wurde seitens des UBA das Umweltinnovationsprogramm UIP (Förderprogramm des Bundes und der KfW Banken) vorgestellt und entsprechende Fördermöglichkeiten erläutert. Zu diesem Zeitpunkt gab es im Markt keine praktikable Lösung, um die Abtönung einer weißen Wandfarbe ohne Verwendung von Topfkonservierern durchzuführen. Nach Aussage der Anlagenhersteller bestehen weitere Möglichkeiten zur Entwicklung von Innovationen, wobei bereits entwickelte Modellanlagen von den Farbherstellern nicht angenommen worden sind. Die Einführung neuer Abtönkonzepte wurde als zu kostenintensiv erachtet, im Vergleich zum Beibehalt bestehender Systeme, die eine biozide Ausrüstung zur Konservierung der Pigmente brauchen. Diskutiert wurden geschlossene Systeme für Pigmentpasten (Beutel), die technisch auch für die bestehenden Anlagen als machbar angesehen werden.

Eine parallele Weiterentwicklung von Maschinen und Pigmentpasten wurde in dem Gespräch als sinnvoll erachtet, wobei das Zeitfenster in Bezug auf die Entscheidung der Biozidprodukteverordnung (EU) Nr. 528/2012 über die PT 6 (Produktart 6 Topfkonservierung und die Überarbeitung der Vergabegrundlage des Blauen Engels) sehr eng ist. Die Entwicklung von konservierungsfreien Produkten gestaltet sich derzeit als schwierig, da im Gegensatz zu weißen Innenraumdispersionsfarben eine Erhöhung des pH von 10-11 für einige organische Pigmente kritisch sein kann.

5.4 Erprobung von qPCR zur Quantifizierung von Bakterien in verschiedenen Substraten

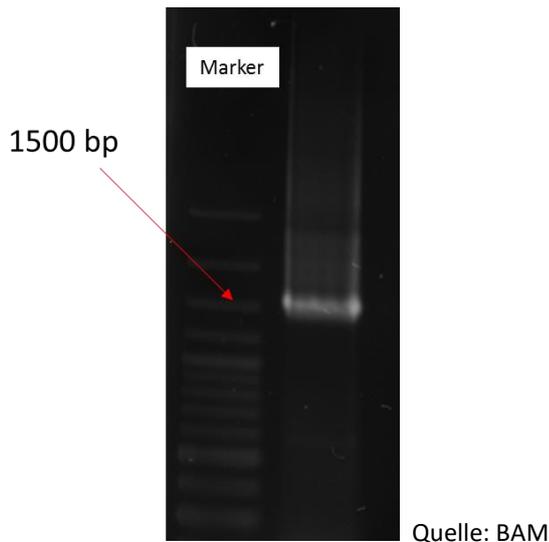
Bei Informations- und Diskussionsveranstaltungen mit der Farbenindustrie (Rohstofflieferanten, Farbherstellern, Hersteller von Biozidprodukten) und bei Werksbesichtigungen bei Farbherstellern wurde die spezielle Problematik der ausreichenden Bioziddosierung zur Topfkonservierung diskutiert.

Als besonders problematisch erwies sich dabei, dass der Gehalt an Mikroorganismen in den Rohstoffen bei Anlieferung unbekannt ist. Herkömmliche Methoden zur Quantifizierung des Keimgehaltes nehmen aufgrund der langen Inkubationszeit ca. 2- 3 Tage in Anspruch, bevor eine quantitative Auswertung erfolgen kann. Die Rohstoffe können jedoch i.d.R. nicht über solch einen langen Zeitraum zwischengelagert werden, sondern werden dem Industrieprozess innerhalb eines Tages zugeführt. Zudem können bei der industriellen Verarbeitung der Rohstoffe im Werk der entstehenden Farbe Keime auch durch bereits existierende Biofilme in den Werksanlagen zugeführt werden. Dies hat zur Folge, dass auch „saubere“ Rohstoffe zu keimhaltigen Endprodukten führen können. Auch hier lässt die mehrtägige Inkubationszeit zwischen Probenahme und Ergebnis, wie sie bei dem herkömmlichen Ausstrichverfahren zur Bestimmung des Keimgehaltes angewandt wird, kein gezieltes Eingreifen in den Industrieprozess zu. Somit ist es nicht bekannt, wie viele Keime sich zum Zeitpunkt der Zugabe der Topfkonservierung im Produkt befinden. Aus diesem Grund wird in einer Vielzahl der Betriebe das Maximum der zugelassenen Biozidkonzentration im Rahmen des Blauen Engels angestrebt (derzeit je 100 ppm MIT und BIT). Wenn der Eintrag von Bioziden gesenkt werden soll, so wäre die zeitnahe Qualitätskontrolle von Rohstoffen und Produkten von großem Vorteil, um angemessen reagieren zu können (z.B. Reklamation beim Zulieferer und/oder kurative Behandlung der Rohstoffe durch chemische oder physikalische Desinfektion).

Somit ist eine Methode erforderlich, die in relativ kurzer Zeit Auskunft über Art und Quantität der Keime geben kann, um schneller auf ansteigende Keimgehalte reagieren zu können. Im Forschungsvorhaben wurde untersucht, ob die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) eine geeignete Methode darstellt. Hierbei werden definierte Regionen von Mikroorganismen mittels spezifischer Primer amplifiziert und folgend der DNA Gehalt in Probe quantifiziert. Sollte sich diese Methode als geeignet erweisen, könnte die Zeit zur Bestimmung des Keimgehaltes deutlich reduziert werden, wodurch der Biozideinsatz effektiver gesteuert werden könnte. Die Herausforderung bei der Etablierung dieser Methode liegt jedoch in der Gewinnung der DNA aus den verschiedenen Substraten (z.B. polymere Dispersion, Bindemittel, Pigmente). Nur wenn diese quantitativ und reproduzierbar aus der Matrix gelöst werden können, wird eine Reproduktion der Ergebnisse möglich. Bei genauerer Einschätzung der Keimgehalte vor der Abfüllung in das Gebinde, kann der Topfkonservierer für seine Anwendung genauer dosiert werden.

5.4.1 Isolierung von DNA aus Dispersionsfarbe

Zunächst wurde versucht, aus einer Dispersionsfarbe chromosomale DNA zu isolieren. Dazu wurde die Farbe mit einer Kultur von *P. aeruginosa* angeimpft und anschließend für die Präparation der DNA eingesetzt. Nach Bestimmung des DNA-Gehalts wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, durch die ein konservierter DNA-Bereich (16 S rRNA) amplifiziert wurde. Durch Gelelektrophorese wurde das amplifizierte PCR-Produkt bei 1500 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 20).

Abbildung 20: Bandenmuster nach Amplifikation der 16S rRNA aus *P. aeruginosa*

Es wurden 3,5 ng/ μ l DNA auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

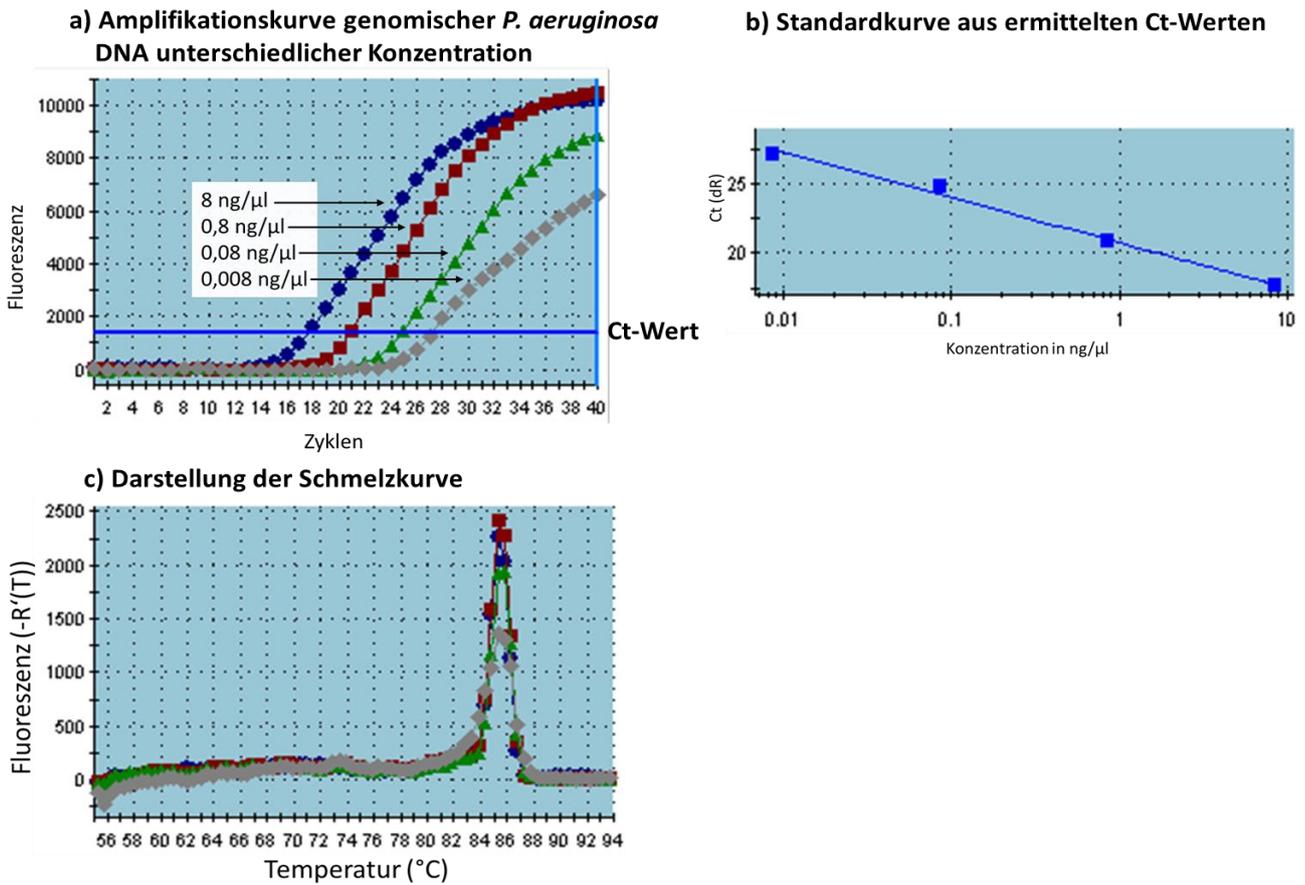
Zur Quantifizierung der amplifizierten Genfragmente wurde im nächsten Schritt die Methode der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt hierbei mit Hilfe der Fluoreszenz-Messung. Als fluoreszierender Farbstoff diente SYBR Green I, der in Lösung nur eine geringe Fluoreszenz zeigt, die jedoch zunimmt, sobald der Farbstoff an doppelsträngige DNA bindet. Somit ist das Fluoreszenzsignal einer Reaktion proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA und steigt an, wenn das Target amplifiziert wird, wodurch eine Quantifizierung der DNA möglich ist. Die optimierten und angepassten Bedingungen für die qPCR sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

5.4.2 Etablierung der qPCR für die Bakterien *P. aeruginosa* und *B. subtilis*

Die absolute Quantifizierung erfolgte mittels isolierter DNA von *P. aeruginosa*, die in verschiedenen Verdünnungen als Standard eingesetzt wurde. Zur Quantifizierung wird der Anfang der exponentiellen Phase genutzt, d.h. der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, auch als Ct-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet. Abbildung 21a zeigt die Fluoreszenzkurven für vier Amplifikationen mit unterschiedlichen Template-DNA Mengen aus *P. aeruginosa*. Die einzelnen Phasen der PCR lassen sich dabei in Echtzeit verfolgen. Aus den Ct-Werten und der Konzentration des eingesetzten Standards lässt sich die Standardkurve ermitteln (Abbildung 21b), aus deren Steigung für jeden Ct-Wert auf die relative Anfangskonzentration an Template geschlossen werden kann. Mit einer Effizienz von 103% und einem „Slope“ von -3,3 („Slope“-Sollwert: -3,1 bis -3,6 und Effizienz-Spannbreite 90-110 %) zeigt diese Standardreihe optimale Werte.

Da der Farbstoff SYBR Green I unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und somit keine Unterscheidung zwischen Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten (wie z.B. Primerdimeren) erlaubt, ist eine Überprüfung der Spezifität der qPCR anhand einer Analyse der PCR-Produkte erforderlich. Bei der sog. Schmelzkurvenanalyse wird nach Beenden der Amplifikationsreaktion die Temperatur in kleinen Schritten kontinuierlich erhöht und die Fluoreszenz aufgezeichnet. Sobald die doppelsträngige DNA denaturiert, wird der Farbstoff SYBR Green I freigesetzt und es kommt zu einer Abnahme in der Fluoreszenz, die ihr Maximum erreicht, wenn beide Stränge vollständig voneinander getrennt werden. Die erste Ableitung der Fluoreszenzabnahme wird anschließend gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 21c). Da doppelsträngige DNA spezifischer PCR-Produkte einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Amplifikate, ist eine Unterscheidung möglich.

Abbildung 21: Datenerhebung zur Bestimmung von DNA Mengen von *P. aeruginosa* durch qPCR



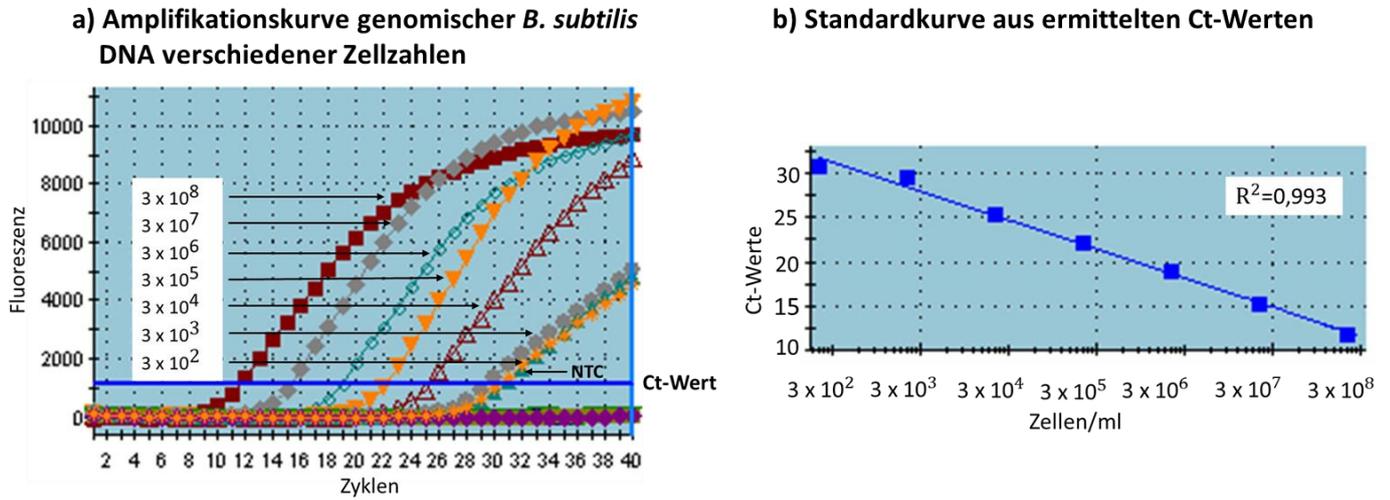
Quelle: BAM

Berechnungen ergaben, dass aus $1 \cdot 10^9$ KBE/ml von *Pseudomonas aeruginosa* 0,3 mg DNA gewonnen werden konnten. Zwei weitere Berechnungen ergaben für $1 \cdot 10^9$ KBE/ml 0,25 mg DNA sowie 0,21 mg DNA.

Bei der Quantifizierung der DNA zeigten sich gute Übereinstimmungen mit der Absorptionsbestimmung bei 260 nm im Spektralphotometer, wenn isolierte DNA von *P. aeruginosa* als Probe bei der qPCR eingesetzt wurde. Wurde dagegen die isolierte DNA aus Farbe mit der qPCR über die Standardreihe quantifiziert, zeigten die gemessenen Konzentrationen erhebliche Abweichungen zur Absorptionsbestimmung. Um den Schritt der DNA-Isolierung zu umgehen, wurde in Anlehnung an die Kolonie-Polymerasekettenreaktion ein Versuch zur Quantifizierung der Bakterien-DNA mit lebenden Zellen durchgeführt. Hierbei wird keine gereinigte DNA eingesetzt, sondern Bakterienzellen direkt aus dem Kulturmedium verwendet. Eine definierte Zellsuspension wurde mit Rohstoff versetzt und direkt als Template zur Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe der qPCR eingesetzt. Sowohl eine Verlängerung der Initialdenaturierung als auch die Erhöhung der Magnesiumkonzentration im Versuchsansatz führten zu keinen messbaren Ct-Werten. Damit ist der erste Schritt, die Isolierung der zu bestimmenden Bakterien-DNA in jedem Fall erforderlich. Nach den Versuchen mit dem gramnegativen Bakterium *P. aeruginosa* wurde das grampositive Bakterium *B. subtilis* für die Quantifizierung mit der qPCR eingesetzt. Für die quantitative Bestimmung wurde die Zellzahl mittels Zählkammer bestimmt und auf 1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Es folgte eine DNA-Isolierung und eine serielle Verdünnung der DNA. Mit diesen unterschiedlichen DNA-Konzentrationen wurden qPCR-Läufe durchgeführt. In Abbildung 22 a) ist die serielle Verdünnung der einzelnen DNA-Ansätze dargestellt. Die DNA-Menge, gewonnen von 3×10^8 Zellen/ml, zeigte einen Ct-Wert von 11,6, während bei 3×10^2 Zellen/ml der Ct-Wert bei 30,8 lag. Damit war die Nachweisgrenze erreicht, denn die Kontrolle ohne Template (NTC) wies einen Ct-Wert von 30,4 auf.

In Abbildung 22 b) sind die Ct-Werte der unterschiedlichen DNA-Konzentrationen gegen die Zellzahl in logarithmischer Skalierung aufgetragen und stellen die Kalibrierungsgrade dar. Diese Kalibrierung zeigt eine gleichmäßige Vervielfältigung des DNA-Templates während des qPCR-Laufs.

Abbildung 22: Datenerhebung zur Bestimmung von DNA Mengen von *B. subtilis* durch qPCR



Quelle: BAM

Abbildung 23: Elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate von *B. subtilis* nach qPCR

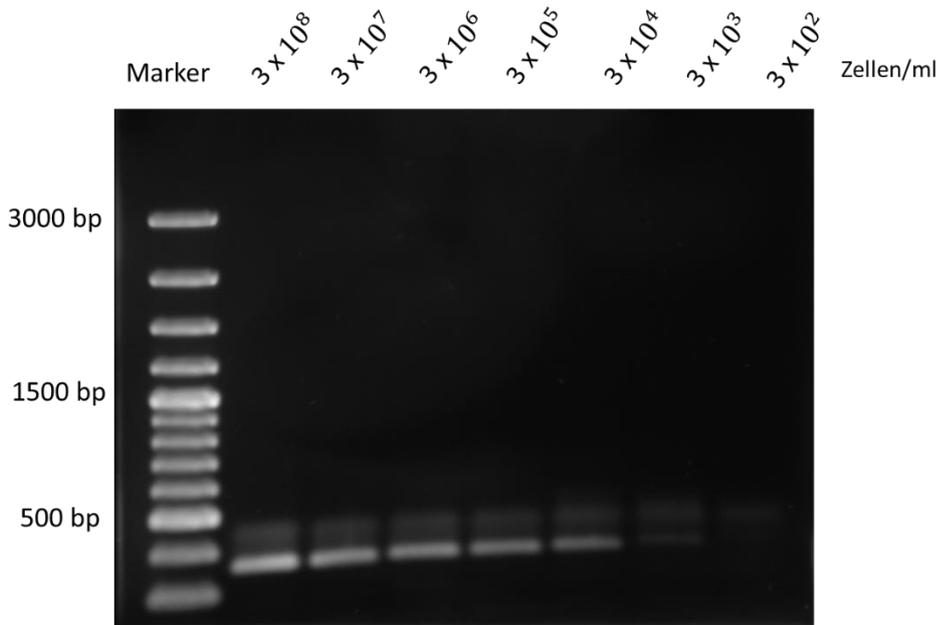


Abbildung 23 zeigt die Banden nach elektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten DNA nach der qPCR. Die Banden der PCR-Produkte lagen wie erwartet bei 350 bp und zeigten eine abnehmende Bandenstärke bei abnehmender Konzentration.

5.4.3 Isolierung von DNA aus Rohstoffen

Als Rohstoffe kamen die in Tabelle 46 aufgeführten Substanzen von zwei verschiedenen Farbenherstellern zum Einsatz.

Tabelle 46: Eingesetzte Rohstoffe

Rohstoff	Beschreibung
1	Reinacrylatdispersion 1 (pH 8)
2	Reinacrylatdispersion 2 (pH 8)
3	Vinylacetat-Ethylen-Dispersion (pH 6)
4	Bindemittel (Basis Vinylacetat-Ethylen 53 % (pH 6)
5	Bindemittel (Basis Styrol-Acrylat 50 % (pH 8)
6	Pigmentpaste
7	Titandioxid slurry (pH 7-8)

Zu Beginn der Versuche wurden die Rohstoffe auf Nähragarplatten (Caso- und PDA, siehe Material und Methoden) ausgestrichen und auf mikrobielles Wachstum überprüft. Hierbei wurden weder Bakterien noch Hefe- oder Schimmelpilze nachgewiesen. Anschließend wurde untersucht, ob die jeweiligen Rohstoffe allein einen Nährboden für *P. aeruginosa* darstellen. Dazu wurden jeweils 50 g Rohstoff eingewogen und 1%-ig mit einer eingestellten Zellsuspension ($1 \cdot 10^9$ KBE/ml) von *P. aeruginosa* angeimpft. Zur Bestimmung der mikrobiellen Anfangsbelastung der Proben wurden geeignete Verdünnungsstufen auf Nähragarplatten ausplattiert und bei $30 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ inkubiert. Bei allen Rohstoffen wurde zum Zeitpunkt t_0 eine Zellzahl zwischen $5 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^7$ KBE/ml nachgewiesen. Die angeimpften Rohstoffe wurden anschließend bei 30 °C gelagert und nach einer Woche hinsichtlich eines bakteriellen Wachstums überprüft. Bei keinem Rohstoff war unter diesen Bedingungen ein Wachstum von *P. aeruginosa* zu verzeichnen. Anschließend wurde getestet, ob sich die Bakterien-DNA aus den Rohstoffen isolieren lässt. Dazu wurde eine definierte Zellsuspension von *P. aeruginosa* ($1 \cdot 10^{10}$ KBE/ml) mit dem jeweiligen Rohstoff 1:1 gemischt und die chromosomale DNA direkt danach mittels Kit isoliert. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit dem Spektralphotometer bestimmt. Als Kontrolle diente eine Zellsuspension von *P. aeruginosa* in physiologischer Kochsalzlösung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengefasst.

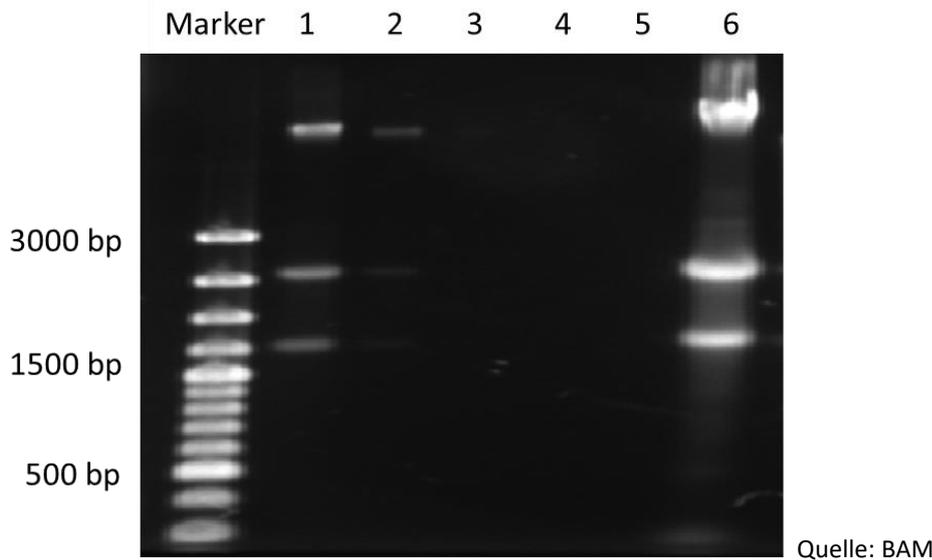
Tabelle 47: Bestimmung des DNA-Gehalts aus Rohstoffen

Rohstoff	DNA-Konzentration
1	12,1 ng/ μ l
2	19,8 ng/ μ l
3	0,7 ng/ μ l
4	6,5 ng/ μ l
5	10,0 ng/ μ l
6	0,2 ng/ μ l
7	10,6 ng/ μ l
Kontrolle	19,3 ng/ μ l

Tabelle 47 zeigt, dass die Wiederfindung der DNA nicht bei allen Rohstoffen gleich ist, zum Teil treten erhebliche Verluste auf. Ein Grund ist sicherlich, dass die Rohstoffe sehr viskos sind und es bei der Aufreinigung zu Verstopfungen der Säulen des DNA-Isolierungskits kommt. Aus diesem Grund wurde folgend die DNA-Aufreinigung mit der klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die Zellzahl von *P. aeruginosa* ($1 \cdot 10^{10}$ KBE/ml) bestimmt und verschiedene Verdünnungsstufen davon angesetzt (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000).

Jede Verdünnungsstufe wurde 1:1 mit dem Rohstoff Reinacrylatdispersion 2 gemischt und die DNA anschließend isoliert. Ein Ansatz von *P. aeruginosa* in physiologischer Kochsalzlösung diente als Kontrolle. Die isolierte DNA wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 24).

Abbildung 24: Isolierung von DNA verschiedener Verdünnungsstufen aus der angeimpften Reinacrylatdispersion 2



Die isolierte DNA von *P. aeruginosa* wurde auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Spur 1: unverdünnt, Spur 2: 1:10, Spur 3: 1:100, Spur 4: 1:1000, Spur 5: 1:10000, Spur 6: Kontrolle.

Vergleicht man die Menge an isolierter DNA der unverdünnten Ansätze (Spur 1: DNA isoliert aus Rohstoff, Spur 6: DNA isoliert aus physiologischer Kochsalzlösung) wird auch hier deutlich, dass es während der DNA-Isolierung in Anwesenheit vom Rohstoff zu einem deutlichen Verlust der DNA-Konzentration kommt. Dies konnte in der anschließenden qPCR bestätigt werden, siehe hierzu die bestimmte DNA-Konzentration von 14 ng/µl für die unverdünnte Probe gegenüber der Kontrolle mit 384 ng/µl in Tabelle 48.

Tabelle 48: qPCR mit isolierter DNA verschiedener Verdünnungsstufen aus künstlich beimpfter Reinacrylatdispersion 2

Probe	CT-Wert	ng/µl berechnet
Standard 16 ng/µl	15,07	-
Standard 1,6 ng/µl	17,63	-
Standard 0,16 ng/µl	20,94	-
Standard 0,016 ng/µl	23,31	-
Standard 0,0016 ng/µl	25,27	-
NTC	30,67	-
0	20,69	13,7
1:10	22,78	2,2
1:100	26,28	0,098
1:1000	28,84	0,01
1:10000	30,89	0,0017
Kontrolle	16,92	383,5

Wie aus den Daten ersichtlich ist, werden die einzelnen Verdünnungsstufen erfasst und somit eine Größenordnungsbestimmung ermöglicht. Es wird jedoch auch deutlich, dass bei Anwesenheit des Rohstoffs DNA verloren geht. Vermutlich wird beim ersten Schritt der DNA-Extraktion (die Zentrifugation der Zellsuspension) nicht das komplette Zellpellet erfasst. Möglicherweise behindern die Rohstoffmoleküle die Pellettierung, wodurch keine vollständige Wiederfindung der DNA-Konzentration möglich ist. Im Vergleich führte die klassische DNA-Isolierung mit Phenol-Chloroform zu keinen größeren Ausbeuten an DNA in Anwesenheit des Rohstoffs als die Nutzung des DNA-Isolierkits.

6 Diskussion und Schlussfolgerungen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde der Biotest (RAL-UZ 102), zur Checkliste gemäß Anhang 1, überarbeitet und ein Verfahrensablauf erstellt, nach dem in Zukunft die Gebrauchstauglichkeit von Topfkonservierern bestimmter Konzentration in wasserbasierten Innenraumbauprodukten geprüft wird. Bisher wurden bei der Vergabe des Umweltzeichens „Blauer Engel“ bezüglich der Wirksamkeit von Konservierungsmitteln gegenüber Mikroorganismenbefall im Gebinde die Ergebnisse aus der Prüfung mit weißen Innenraumwandfarben als maßgeblich für alle anderen Innenraumbauprodukte betrachtet. Es ist jedoch offensichtlich, dass sich die Bauprodukte in vielerlei Hinsicht voneinander unterscheiden, wie z. B. in ihrer Viskosität oder dem Wassergehalt. Im Forschungsvorhaben wurde überprüft, ob die Ergebnisse für weiße Innenraumdispersionsfarben auf Dispersionsklebstoffe übertragbar sind.

6.1 Revision des Gebrauchstauglichkeitstests

Ausgehend von den Untersuchungen und Ergebnissen mit weißer Innenraumdispersionsfarbe wurden folgende Veränderungen bei der Durchführung des Testverfahrens vorgeschlagen:

1. Zusätzliche Berücksichtigung einer künstlichen Alterung

Im Rahmen der Überarbeitung des Biotests wurde eine künstliche Alterung der Produkte in das Testverfahren aufgenommen. Die Produkte wurden dazu über einen Zeitraum von vier Wochen bei 40 °C gelagert und anschließend hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Mikroorganismen untersucht. Nach Diskussion mit den Farb- und Konservierungsmittelherstellern wurde beschlossen, für die künstliche Alterung verschiedene Temperaturstufen in die Methode aufzunehmen, um den Anforderungen der einzelnen Produkte besser gerecht zu werden. In Anlehnung an die Methode 46.3 (accelerated storage procedure, Stand 2017) der CIPAC (Collaborative international pesticides analytical council) sind folgende Temperaturen für die künstliche Alterung möglich:

54 ± 2 °C:	14 Tage
50 ± 2 °C:	4 Wochen
45 ± 2 °C:	6 Wochen
40 ± 2 °C:	8 Wochen
35 ± 2 °C:	12 Wochen
30 ± 2 °C:	18 Wochen

Die Durchführung des mikrobiologischen Belastungstests zeigte, dass bereits innerhalb einer Produktgruppe die Ergebnisse nicht aufeinander übertragbar sind. Innenraumdispersionsfarben mit einer MIT/BIT Konservierung waren nach der künstlichen Alterung der Proben in geringerem Maß anfällig gegenüber mikrobiellem Befall als die ungealterten Proben. Die Ursache dafür ist nicht bekannt, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass während der Alterung Abbauprodukte der Konservierungsmittel entstehen, die eine höhere Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen haben.

Bei der Innenwandfarbe, die mit ZnP/BIT konserviert war, wurde nach der Alterung dagegen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Bakterien beobachtet. Die Farbe wurde vor dem Belastungstest werks-

seitig desinfiziert, um ein konservierungsmittelfreies Produkt zu erhalten. Nach Ablauf des Belastungstests wurde bei der unkonservierten Farbe nur nach der künstlichen Alterung ein bakterielles Wachstum nachgewiesen. Die ungealterte Farbe hingegen erlaubte kein Wachstum von Bakterien. Es ist denkbar, dass das Desinfektionsmittel erst während der künstlichen Alterung vollständig abgebaut bzw. unwirksam wurde und somit ein Wachstum der Bakterien erlaubte. Auch zwei weitere Farben, die mit verschiedenen ZnP/BIT-Konzentrationen konserviert waren, waren nach der künstlichen Alterung anfälliger gegenüber Bakterien (siehe 3.1.3).

Auch bei den Klebstoffen zeigte sich nach Alterung der Proben bei dem unkonservierten Klebstoff eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Bakterien. Die Tatsache, dass bei dem Klebstoff mit einer geringeren Konservierungsmittelkonzentration (Mischung) weder ein Wachstum noch ein Auftreten von Kolonien nachweisbar war, lässt vermuten, dass die vorhandene Konzentration von MIT und BIT ausreicht, um das Produkt effektiv gegenüber Mikroorganismen zu schützen. Damit unterscheidet sich der Bodenbelagsklebstoff von den Wandfarben, bei denen im Belastungstest mit Bakterien unter gleichen Bedingungen die Ausbildung von Kolonien nachgewiesen wurde.

2. Bestimmung des Biozidgehalts in den Innenraumbauprodukten

Die Bestimmung des Konservierungsmittelgehalts in einem Produkt ist von besonderer Bedeutung, um Aussagen über die Stabilität des Biozids treffen zu können. Der revidierte Belastungstest sieht eine Kontrolle des Biozidgehalts sowohl vor und nach der künstlichen Alterung als auch nach Ablauf des Belastungstests vor. Auf diese Weise lässt sich unterscheiden, ob eine Zersetzung des Biozids durch künstliche Alterung ein mikrobielles Wachstum ermöglicht oder ob die eingesetzte Konservierungsmittelmenge in dem Produkt zu gering ist.

3. Herabsetzen der Inokulationszyklen

Der bestehende Test nach RAL-UZ 102, Annex 1, geht von einer sehr hohen Keimbelastung in dem abzufüllenden Produkt aus (100 bis 1000 Millionen Keime je Milliliter). Derzeit wird ein wiederkehrender Belastungstest durchgeführt, bei dem das Produkt sechsmal mit dieser hohen Keimzahl angeimpft wird. Es ist jedoch zweifelhaft, ob in der Realität vor Abfüllung des Produkts in ein Gebinde eine derart hohe Keimbelastung vorliegt. Folgende Ereignisse können potentiell zum Keimeintrag in ein Gebinde führen:

- In einer Produktionsanlage finden sich an mehreren Stellen Toträume, in denen sich Rückstände bilden können, wodurch die Ausbildung eines Biofilms begünstigt wird. Durch Ablösen des Biofilms kommt es schließlich zu einem hohen lokalen Keimeintrag beim Einfüllen des Produkts in das Gebinde.
- handelsübliche Farbeimer sind nicht vollkommen luftdicht, so dass ein Gasaustausch mit der Umgebung stattfindet und auf diesem Wege geringfügige Mengen an Keimen in das Produkt gelangen.
- Eine weitere mikrobiologische Belastung des Produkts erfolgt schließlich bei Öffnen des Farbeimers durch den Kunden und die Nutzung verschmutzter Werkzeuge (Pinsel, Farbrollen etc.).

Unter Annahme eines schlimmsten Falles wird daher im überarbeiteten Testverfahren die Gebrauchstauglichkeit von Konservierungsmitteln in einem Produkt durch dreimalige Beimpfung mit einer Mikroorganismensuspension hoher Zellzahl ($1 \cdot 10^8$ - $5 \cdot 10^8$ KBE/ml bei Bakterien und $8 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^8$ KBE/ml bei Hefen) geprüft. Es wird bewusst nicht in Betracht gezogen, dass der Verbraucher die Farbe nach der ersten Nutzung über längere Zeiträume unsachgemäß lagert oder mehrere Male mit verschmutzten Werkzeugen Farbe entnimmt. Informationen zur Lagerfähigkeit nach dem ersten Öffnen des Gebindes sollten für den Kunden vom Hersteller bereitgestellt werden.

4. Einführen eines Tests für Hefen und Schimmelpilze

Der derzeit gültige biologische Gebrauchstauglichkeitstest prüft nur mit Bakterien; Schimmel- und Hefepilze werden nicht berücksichtigt. Bei Diskussionen mit Vertretern der Farbenindustrie wurde deut-

lich, dass insbesondere auch Hefen problematisch sein können. Die in diesem Vorhaben durchgeführten Versuche mit Dispersionsinnenfarbe zeigten, dass sich Hefen und Bakterien durchaus unterschiedlich verhalten. Wurde eine VA/E-haltige Farbe mit einem geringeren Konservierungsmittelgehalt eingesetzt (Mischung 1), waren nach der künstlichen Alterung keine Bakterien mehr nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass diese Farbe unter den Testbedingungen ausreichend gegenüber bakteriellem Befall geschützt war. Wurde der Versuch mit Hefen durchgeführt, waren unter den gleichen Bedingungen Kolonien nachweisbar, wodurch eine höhere Konservierung des Produkts erforderlich wird. Dies zeigt, dass es von großer Bedeutung ist, neben Bakterien auch Hefen bei dem Testverfahren zu berücksichtigen. Erst durch Untersuchungen mit verschiedenen Mikroorganismen lassen sich Aussagen über die notwendige Konservierung des Produkts treffen. Die Versuche mit den Schimmelpilzen zeigten lediglich bei einer künstlich gealterten Farbe ein Wachstum von Schimmel an der Oberfläche des Produkts.

5. Quantitative Bestimmung der Zellzahl

Die derzeit gültige Methode prüft, ob ein bestimmter Gehalt an Biozid eine Desinfektion des Produkts vor Abfüllung in ein Gebinde bewirken kann. Die Probe wird dazu auf einem Nährmedium ausgestrichen und hinsichtlich des Auftretens von Kolonien untersucht. Sobald Kolonien auf der Nähragarplatte nachgewiesen werden, gilt der Test als nicht bestanden. Diese qualitative Bestimmung der Zellzahl erlaubt Aussagen hinsichtlich der Sterilität eines Produkts. Gespräche mit Vertretern der Farbindustrie zeigten, dass ein Keimgehalt von 10^2 Keimen durchaus als akzeptabel angesehen wird. Hierbei muss sichergestellt werden können, dass es zu keinem unkontrollierten Wachstum der Mikroorganismen und damit einhergehend zu einem Qualitätsverlust des Produktes kommt. In der überarbeiteten Prüfmethode wird eine quantitative Bestimmung der Zellzahl bei jedem Beimpungszyklus, sowie zu Beginn und nach Ablauf des Belastungstests, gefordert. Auf diese Weise erhält man Informationen darüber, ob ein mikrobielles Wachstum vorliegt oder ob die Mikroorganismen weiterhin lebensfähig sind, sich jedoch nicht vermehren können.

Die Ergebnisse der Belastungstests mit Wandfarben und Bodenbelagsklebstoffen zeigen, dass die Anforderungen an die Konservierung nicht von einem Produkttyp auf andere übertragbar sind. Bereits innerhalb der Produktgruppe Wandfarben wurde eine Abhängigkeit des Konservierungsmittelbedarfs von der Art des Bindemittels und den verwendeten Mikroorganismen (Bakterien, Hefen oder Schimmelpilze) nachgewiesen. In den vorliegenden Untersuchungen war Klebstoff, konserviert mit der Hälfte der für Farben erforderlichen Konservierungsmittelkonzentration, bereits ausreichend gegenüber mikrobiellem Befall geschützt.

Diese Beispiele zeigen, dass die Mindestmengen, die zur Gebindekonservierung erforderlich sind, spezifisch für einen Produkttyp sein können. Bei Farben könnte die Erfassung verschiedener Produkttypen z.B. über das Bindemittel definiert werden. Die Farbindustrie wurde nach Vorstellung der Ergebnisse und anschließender Diskussion im Dezember 2017 aufgefordert, hierzu Vorschläge zu unterbreiten.

Bei der Festlegung der erforderlichen Mengen an Gebindekonservierung sollte eine worst-case-Betrachtung maßgeblich sein. Es gilt hierbei, dass alle Gruppen von Mikroorganismen bei gealterten und ungealterten Produkten durch das eingesetzte Konservierungsmittel unter 1000 Keimen je ml Produkt zu halten sind. Ausdrücklich zugelassen soll die zusätzliche Prüfung mit Industriekeimen sein, sofern diese molekularbiologisch definiert und in einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt und zugänglich sind. Sollten diese „Industriekeime“ höhere Konservierung nachweislich erforderlich machen, so ist auch dieses Ergebnis als „worst-case“ in Betracht zu ziehen.

6.2 Alternativer Schutz von wasserbasierten Innenraumfarben

Wasserbasierte Dispersionsfarben bieten Bakterien und Pilzen oft geeignete Wachstumsbedingungen. Für die meisten Farben stellt die Topfkonservierung daher eine Möglichkeit dar, dass Produkt gegenüber mikrobiellem Befall zu schützen. Die eingesetzten Isothiazolinone stehen jedoch aufgrund ihres allergenen Potentials in der Kritik und somit sind alternative Verfahren erforderlich, um wasserbasierte Produkte effektiv gegenüber Wachstum von Mikroorganismen im Gebinde zu schützen.

Konservierungsmittelfreie Farben

Durch die geplante Einstufung von MIT als 1A Sensitiser mit einer SCL (specific concentration limit) von ≥ 15 ppm (0,0015 %) und die vorgeschlagene Neueinstufung von Zinkpyrithion als reproduktionstoxisch Kategorie 1B sind Alternativen zur Konservierung von Dispersionsfarben gefragt. Einige Farbhersteller haben bereits Silikatfarben in ihrem Sortiment, welche als konservierungsmittelfrei deklariert sind und somit auch gut für Allergiker geeignet sind. Es werden dabei drei Typen von Silikatfarben unterschieden: die reine Silikatfarbe, Dispersionssilikatfarben und Sol-Silikatfarben. Allen diesen Farben ist gemein, dass sie als Bindemittel Wasserglas enthalten, das mit der mineralischen Oberfläche verkieselt und infolge dessen zu einer hohen Langlebigkeit führt. Die Farben zeichnen sich zudem durch eine hohe Alkalität aus, welche das Wachstum von Mikroorganismen verhindert. Trotz des offensichtlichen Vorteils der Konservierungsmittelfreiheit bleibt zu berücksichtigen, dass es sich bei Silikatfarben um Produkte mit einem hohen alkalischen pH-Wert (pH 10,4-11,1) handelt. Gemäß der CLP-Verordnung werden Stoffe und Gemische mit einem pH von mindestens 11,5 als hautätzend der Kategorie 1 eingestuft und müssen entsprechend deklariert werden (GHS05, H 314 und P-Sätze). Wird ein Stoff oder ein Gemisch unter Berücksichtigung der alkalischen Reserve trotz des hohen pH-Werts für nicht hautätzend gehalten, so ist dies durch eine geeignete in-vitro-Prüfung zu belegen (Abschnitt 3.2.3.1.2, Anhang 1 der CLP-Verordnung). Bei den Silikatfarben bleibt zudem zu berücksichtigen, dass sie nicht gleichermaßen für alle Oberflächen geeignet sind und auch viele organische Pigmente bei hohen pH-Werten nicht stabil sind, wodurch es zu einer Einschränkung bei den Farbtönen kommt. Des Weiteren sind sie für Druckfarben und viele Lacke nicht realisierbar, da die Rohstoffe bei einem hohen pH-Wert instabil sind. Können gesundheitliche negative Folgen für den Verbraucher ausgeschlossen werden, können Silikatfarben dennoch eine gute Alternative zu konservierungsmittelhaltigen Farben darstellen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich Mikroorganismen über die Zeit an den erhöhten pH-Wert adaptieren und neue Strategien zum Produktschutz erforderlich werden. Nach dem aktuellen Stand der Technik ist ein kompletter Verzicht auf Konservierungsmittel nicht in allen Farben und Lacken möglich.

Sterile Produktion

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde diskutiert, ob es Möglichkeiten gibt, eine Farbe steril zu produzieren und somit eine bessere Haltbarkeit des Produkts zu erreichen. Bei der Produktion von Dispersionsfarben handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem der Keimeintrag so früh wie möglich verhindert werden soll. Bei den innerhalb des Forschungsprojektes durchgeführten Werksbegehungen wurde gezeigt, dass die Anlagen in regelmäßigen Abständen nach einem Hygieneplan gereinigt und desinfiziert werden. Zudem wird bei neuen Produktionsanlagen auf eine gradlinige und verzweigungsfreie Zufuhr der Stoffe in die Produktion geachtet. Dennoch gibt es an mehreren Stellen Toträume, bei denen ein mikrobielles Wachstum durch Rückstände aus der Produktion nicht verhindert werden kann. Problematisch erweist sich laut Herstellerangaben zudem, dass besonders mineralische Rohstoffe nicht keimfrei sind und folglich zunächst sterilisiert werden müssten. Bestrahlungsmethoden sind dabei aufgrund der Absorptionseigenschaften der Rohstoffe allerdings nicht möglich oder können bei polymeren Bindemitteln zu einem Abbau und zu einer Veränderung des Produkts führen. Auch ein Erhitzen der Rohstoffe ist nicht geeignet, da viele Dispersionen und Additive thermo-instabil sind. Zudem kann auf diesem Wege nicht garantiert werden, dass alle Sporen abgetötet werden. Auch eine Sterilisation durch autoklavieren ist nicht umsetzbar, da es unter diesen Bedingungen zu einer Vernetzung der polymeren Bestandteile käme, wodurch die Dispersionsfarbe unbrauchbar würde. Laut Farbenhersteller ist es somit nicht möglich, die einzelnen Bestandteile einer Farbe problemlos zu sterilisieren. Es wurde auch diskutiert, ob es realisierbar wäre, anstelle der Rohstoffe das Endprodukt zu sterilisieren, bevor es in das Gebinde abgefüllt wird. Auch hierfür gibt es bisher kein technisch geeignetes Verfahren, mit dem die Dispersionsfarbe sterilisiert werden kann, ohne sie in ihren Eigenschaften nachteilig zu verändern.

6.3 Die qPCR zur Quantifizierung mikrobieller Verunreinigungen in Rohstoffen

Mikrobielle Verunreinigungen von Farben können zu einer verminderten Produktqualität führen. Da Dispersionsfarben Naturstoffe wie Kreide oder Zellulose enthalten, sind diese eine Nahrungsquelle für Mikroorganismen. Oft erhalten die Farbhersteller Rohstoffe, die bereits mit Keimen verunreinigt sind. Durch die Stoffwechselfvorgänge der Mikroorganismen kann das Produkt geschädigt werden. Die Bestimmung der Keimzahl mit Hilfe von Agarplatten ist allerdings sehr zeitaufwendig (Inkubationszeit 2-3 Tage). Dieser Zeitraum ist zu lang, um gezielt in den Industrieprozess einzugreifen und die Biozidkonzentration anzupassen, die das Bakterienwachstum während der Lagerung verhindert und eine längere Haltbarkeit gewährleistet. Daher sollte in diesem Projekt eine schnelle Quantifizierung der Keimbelastung mit Hilfe der qPCR untersucht werden.

Erste Versuche zeigten, dass es qualitativ möglich ist, DNA von *P. aeruginosa* aus angeimpfter Dispersionsfarbe zu isolieren und durch die PCR nachzuweisen. Für die Quantifizierung mit Hilfe der qPCR wurde zunächst eine Kalibrierungsgerade für die Bestimmung der DNA-Konzentration von *P. aeruginosa* optimiert und schließlich eine Effizienz von 103% sowie eine Steigung von -3,3 erzielt. Ebenso gelang es, eine Kalibrierungsreihe für das grampositive Bakterium *B. subtilis* zu etablieren. Für die Hefe *Candida lipolytica* dagegen war es nicht möglich, eine Kalibrierungsgerade zu erstellen; die Schmelzkurven wiesen immer wieder Primerdimere auf, die auf unspezifische Amplifikate hinwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei den folgenden Untersuchungen gelang es, Bakterien-DNA aus gezielt mikrobiell belasteten Rohstoffen zu isolieren. Jedoch hing die Wiederfindung der DNA von der Beschaffenheit des jeweiligen Rohstoffs ab. So ließ sich zum Beispiel keine DNA aus Pigmentpaste isolieren. Bei der Wiederfindung der DNA in künstlich angeimpften Rohstoffen gab es in der Regel erhebliche Abweichungen gegenüber der Kontrolle. Das Problem trat sowohl bei Untersuchungen mit verschiedenen DNA-Isolierungskits als auch bei der DNA-Aufreinigung nach der klassischen Phenol-Chloroform Extraktion auf.

Allein bei der Reinacrylatdispersion 2 wurde DNA aus dem angeimpften Rohstoff, verglichen mit der Kontrolle, vollständig isoliert (siehe Tabelle 47). Allerdings wurde bei der Quantifizierung mit Hilfe der qPCR nur noch etwa 4% der DNA gegenüber der Kontrolle wiedergefunden (siehe Abbildung 24 sowie Tabelle 48). Auch ein Versuch, Bakterien-DNA direkt aus lebenden Zellen mit Hilfe der qPCR zu quantifizieren, misslang. Möglicherweise hat hier die Komplexität des Rohstoffs die qPCR behindert, während die DNA-Isolierung unproblematisch war. Damit zeigten diese Versuche, dass es zwar möglich ist, Bakterien-DNA aus mikrobiell belasteten Rohstoffen zu isolieren, dass es aber nicht gelang diese quantitativ und reproduzierbar aus der Matrix zu lösen. Es traten stets Verluste im Vergleich zu einer wässrigen Zellsuspension auf. Daher wurde auf weitere Untersuchungen zur Fluoreszenz-basierten Differenzierung von toten und lebenden Zellen verzichtet.

Als alternatives Analyseverfahren sollten die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie in Betracht gezogen werden. Bei diesem Verfahren lagert sich ein fluoreszierender Farbstoff an den entsprechenden Zielkeim an und ermöglicht über eine Laserdetektion die Identifikation von Einzelzellen in einer Zellpopulation. Hinderlich könnten hierbei z.B. Autofluoreszenz und Schmutzpartikel aus der Dispersion sein, die zu einer Verfälschung der Zellzahlergebnisse führen könnten.

6.4 Ausblick

Für Dispersionsfarben wurde ein neuer Gebrauchstauglichkeitstest entwickelt. Der neue Test ist aufwendig (getrennte Prüfung von Bakterien, Pilzen und Hefen), er ermöglicht aber genauere Aussagen über Wirksamkeit der Konservierung und damit über die Stabilität der Farbe als der vorhergehende Test der Vergabegrundlage. Daneben gibt es eine stetige Weiterentwicklung von Dispersionsfarben, die nicht mit Bioziden haltbar gemacht werden. Diese neuen Dispersionsfarben haben in der Regel einen höheren pH-Wert unterhalb der Kennzeichnungsgrenze, der die Haltbarkeit der Farbe gewährleisten soll. Diese Entwicklung sollte im Hinblick auf den Blauen Engel weiterbeobachtet werden.

Neben Dispersionsfarben müssen auch andere Bauprodukte konserviert werden wie beispielweise Lacke und Bodenbelagsklebstoffe. Der neu entwickelte Gebrauchstauglichkeitstest sollte grundsätzlich auch für diese Produkte geeignet sein, für die richtige Anwendung und die Bewertung der Ergebnisse

besteht allerdings noch Forschungsbedarf. Für den qPCR-Test gab es verschiedene Überlegungen für sinnvolle Anwendungen im Rahmen der Betriebshygiene. Die Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass verlässliche Aussagen für Dispersionsfarben schwierig sind und eine Anwendung in der Praxis derzeit nicht absehbar ist.

7 Quellenverzeichnis

Alexander, Dave (2015): Preservation techniques for colourant dispersions-info for paper. THOR Group

Bohn, Susanna, Niederer, Markus, Brehm, Klaus und Bircher, Andreas, J. (2000): Airborne contact dermatitis from methylchloroisothiazolinone in wall paint. Abolition of symptoms by chemical allergen inactivation. *Cont. Dermat.* 42,196-201.

Diedering, Manfred und Dimmers, Markus (2014): Biobasierte Beschichtungssysteme: nachhaltige Wandfarbe. *Farbe und Lack* 04, 24-29.

Hinzelmann, Norbert (2016): Biozide in Lacken und Farben analysieren. *Farbe und Lack*, 28. April 2016

Jayjock, M.A., Hazelton, G.A., Lewis, P.G., und Wooders, M.F. (1996): Formulation effect on the dermal bioavailability of isothiazolone biocides. *FD Chem. Tox.* 34(3), 277-282.

Uter, Wolfgang, Geier, Johannes, Bauer, Andrea und Schnuch, Axel (2013). Risk factors associated with methylisothiazolinone contact sensitization. *Cont. Dermat.* 69,231-238.

Plehn, Wolfgang, Roßkamp, Elke und Ullrich, Detlef (2002): Biozidemissionen aus Dispersionsfarben. *WaBoLu-Hefte* 2/02.

CIPAC (Collaborative international pesticides analytical council): Methode 46.3 (accelerated storage procedure), Stand 2017

8 Anhang

8.1 Anlage 4a zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 "Emissionsarme Innenwandfarben"

Durchführung eines Biotests mit Bakterien

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Biozidprodukt* ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest nach folgendem Verfahren durchzuführen:

Eine Labormethode zur Ermittlung der erforderlichen Konzentration eines Biozidprodukts gegen Bakterien in emissionsarmen Innenwandfarben gemäß DE-UZ 102

1. Geltungsbereich

Die Methode kann angewendet werden, um die Wirksamkeit von Biozidprodukten bezüglich der Verhinderung des Wachstums und des Überlebens von Schadorganismen in wässrigen, polymerbasierenden, emissionsarmen Innenwandfarben zu prüfen. Dieses Verfahren wird analog zur Aufnahme von Biozidprodukten in den Anhang 1 der Vergabegrundlage DE-UZ 102 „Emissionsarme Wandfarben“ und beim Nachweis der Eignung für andere Gemische angewendet.

2. Gesundheitshinweis

Nationale Gesundheitsvorschriften müssen bei der Versuchsdurchführung beachtet werden. Gleiches gilt für die EG Richtlinie 200/54/EG 'Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit'. Bei der Handhabung von Dispersionsfarben und Bioziden sind die Angaben in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern und Produktinformationen für den sicheren Umgang mit diesen Produkten zu beachten.

*Produkttyp 6 gemäß der Biozidprodukteverordnung (EU Nr. 528/2012)

3. Geräte und Nährmedien

- geeignete sterile Schraubgefäße (100 ml);
- sterile Messpipetten, Nennvolumen 1,0 ml und 5,0 ml;
- sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 oder 100 mm;
- sterile Verdünnungslösung; z.B. destilliertes Wasser (für Agar) gemäß ISO 3696;
- physiologische Kochsalzlösung (zum Abwaschen und Verdünnen der Bakterienkulturen);
- Waage;
- Pipette und 0,1 cm³ sterile Spitzen;
- Bunsenbrenner;
- Brutschrank, thermostatisierbar (30 +/- 2°C);
- Autoklav;
- sterile Impfösen oder Impfnadeln;
- sterile Spatel;
- sterile Nährmedien für die entsprechenden Mikroorganismen, Zusammensetzung und Herstellung;
- pH-Messgerät;
- Reagenzgläser;
- Bakterien-Stammkulturen;

- Reagenzglasständer;
- Reagenzglasschüttler
- Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)
- Mikroskop

4. Prüfororganismen

Die folgenden Bakterien sollten für den Keimbelastungstest herangezogen werden:

Bakterien:

<i>Alcaligenes faecalis</i>	BAM 604, DSM 6174, ATCC 35655
<i>Escherichia coli</i>	BAM 605, DSM 787, ATCC 11229
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BAM 60, DSM 939, ATCC 15442
<i>Pseudomonas putida</i>	BAM 644, DSM 291 ^T , ATCC 12633
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BAM 607, DSM 5190 ^T , ATCC17588

Weitere Keime, die ständig wiederkehrend zu Infektionen führen, können zusätzlich für eine separate Impfsuspension herangezogen werden. Bei diesen Organismen, die als Reinkulturen vorliegen müssen, soll eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen werden, wodurch der verwendete Bakterienstamm eindeutig bestimmt werden kann. Die Organismen sollen bei einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt werden.

5. Methode

Zu Beginn der Versuche erfolgt eine Eingangskontrolle der zu testenden Materialien. Hierzu wird die Farbe mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Geprüft werden müssen ungealterte Proben als auch künstlich gealterte Proben (s. 5.2). In beiden Fällen muss das Pass/Fail-Kriterium (s. 5.5) erreicht werden.

5.1 Impfsuspensionen-Zubereitung

- 5.1.1 Die Prüfororganismen werden von einer Dauerkultur (z.B. Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert *.
- 5.1.2 Die Bakterien werden von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur) und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert*. Ausschließlich diese Kulturen werden für den Belastungstest eingesetzt.
- 5.1.3 Es werden getrennte Suspensionen von jedem Bakterienstamm zubereitet. Hierzu wird die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung, z.B. physiologische Kochsalzlösung, benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen.
- 5.1.4 Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wird mittels einer geeigneten Zählkammer ermittelt (z. B. Thoma-Kammer, Kammertiefe 0,02 mm). Die Zellzahl der einzelnen Bakteriensuspensionen soll

1*10⁸ – 5 *10⁸ KBE/ml

betragen.

Die vorbereitete Impfsuspension muss noch am gleichen Tag verwendet werden und sollte bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

- 5.1.5 Zur Herstellung der Mischsuspension werden gleiche Volumina jeder einzelnen Bakteriensuspension gemischt. Die Zellzahl soll dann ebenso

1*10⁸ – 5 *10⁸ KBE/ml

betragen.

5.1.6 Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wird durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe der Mischkultur auf CASO-Agar und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten kontrolliert.

* Sollten separat auch hauseigene Prüfstämme verwendet werden, so kann die Inkubationszeit für diese Keime nach Bedarf angepasst werden. Die geänderten Parameter für die Prüfung mit hauseigenen Keimen müssen im Prüfbericht vermerkt werden.

5.2 Künstliche Alterung

5.2.1 Das Biozidprodukt wird in geeigneten Konzentrationsreihen der Dispersionsfarbe hinzugefügt, die Proben kräftig gemischt und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.2 Es werden geeignete Anteile (z.B. 50 g oder 100 g) der Dispersionsfarbe in sterile Schraubgefäße eingewogen und diese fest verschlossen.

5.2.3 Zusätzlich dienen sechs unkonservierte Proben als Kontrollen. Hiervon werden drei Proben mit Bakterien beimpft (Positivkontrolle), die anderen drei Proben bleiben unbeimpft (Negativkontrolle, bzw. Rückstellmuster).

5.2.4 Die Proben werden für 4 Wochen bei $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ oder alternativ für 18 Wochen bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ gelagert.

5.2.5 Nach 4- bzw. 18-wöchiger Alterung wird der Keimbelastungstest wie unter 5.3 beschrieben durchgeführt.

5.3 Keimbelastungstest

5.3.1 Jede Probe (mit Ausnahme der Negativkontrolle) wird mit gleichem Volumen der Mischsuspension äquivalent zu 1,0% des Probengewichtes beimpft. Die Probe wird mit einem sterilen Spatel gut vermischt und die Schraubgefäße anschließend so verschlossen, dass ein Sauerstoffzutritt in das Gefäß gewährleistet ist.

5.3.2 Zur Bestimmung der mikrobiellen Anfangsbelastung aller Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Anschließend sind die Platten bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ für max. 3 Tage zu bebrüten*. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wird mittels eines geeigneten Verfahrens quantitativ ermittelt.

5.3.3 Zur Kontrolle der Vitalität der verwendeten Bakterien wird die Mischsuspension wie unter 5.3.2 beschrieben angesetzt und ausgezählt.

5.3.4 Alle Proben werden für 7 Tage bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ inkubiert.

5.3.5 Zur Bestimmung der Keimzahl in den Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Nach dem Bebrüten der Platten bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ für max. 3 Tage * sind die koloniebildenden Einheiten zu ermitteln.

5.3.6 Die Schritte 5.3.1 bis 5.3.5 werden in wöchentlichen Intervallen wiederholt, bis insgesamt 3 Impfyklen durchgeführt sind. Nach insgesamt 6 Wochen Inkubation bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ist der Test beendet und es wird eine abschließende Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vorgenommen.

5.3.7 Zur Differenzierung der Wirksamkeit verschiedener Biozidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer können zusätzliche Keimzahlbestimmungen, z.B. nach 1 und 3 Tagen nach Beimpfung, durchgeführt werden.

5.4 Validität der Prüfung

Die Prüfung ist valide, wenn die Wachstumsfähigkeit des Inokulums auf CASO-Agar in Petrischalen nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 5.1.6).

5.5 Pass./ Fail Kriterien

5.5.1 Die kurative Wirkung des Biozids in der Farbe durch die eingesetzte Biozidkonzentration ist gegeben, wenn nach Ablauf des Tests die Keimzahl < 1000 KBE/ml ist.

5.5.2 Die Wirksamkeit eines zu prüfenden Biozids kann nicht nachgewiesen werden, wenn in der biozidfreien Farbe nach Beimpfung und Ablauf des Tests die Keimzahl < 1000 KBE/ml ist.

5.6 Nachweis signifikanter Unterschiede

Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden, die signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen in den mit Topfkonservierern behandelten Proben und den unbehandelten Proben ggf. nachweisen können.

Nährmedium CASO-Agar

Das Medium setzt sich aus 1,5 % Pepton aus Casein, 1,5 % Pepton aus Soja, 0,5 % Natriumchlorid und 1,5 % Agar zusammen. Der pH beträgt bei $7,3 \pm 0,2$.

Zubereitung

40 g Nähragar sind in 1 L destillierten Wasser zu suspendieren, bis zum vollständigen Lösen zu rühren und 15 Minuten bei 121°C zu autoklavieren.

8.2 Anlage 4b zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 "Emissionsarme Innenwandfarben"

Durchführung eines Biotests mit Hefen

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Biozidprodukt* ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest nach folgendem Verfahren durchzuführen:

Eine Labormethode zur Ermittlung der erforderlichen Konzentration eines Biozidprodukts gegen Bakterien in emissionsarmen Innenwandfarben gemäß DE-UZ 102

1. Geltungsbereich

Die Methode kann angewendet werden, um die Wirksamkeit von Biozidprodukten bezüglich der Verhinderung des Wachstums und des Überlebens von Schadorganismen in wässrigen, polymerbasierenden, emissionsarmen Innenwandfarben zu prüfen. Dieses Verfahren wird analog zur Aufnahme von Biozidprodukten in den Anhang 1 der Vergabegrundlage DE-UZ 102 „Emissionsarme Wandfarben“ und beim Nachweis der Eignung für andere Gemische angewendet.

2. Gesundheitshinweis

Nationale Gesundheitsvorschriften müssen bei der Versuchsdurchführung beachtet werden. Gleiches gilt für die EG Richtlinie 200/54/EG 'Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit'. Bei der Handhabung von Dispersionsfarben und Bioziden sind die Angaben in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern und Produktinformationen für den sicheren Umgang mit diesen Produkten zu beachten.

*Produkttyp 6 gemäß der Biozidprodukteverordnung (EU Nr. 528/2012)

3. Geräte und Nährmedien

- geeignete sterile Schraubgefäße (100 ml);
- sterile Messpipetten, Nennvolumen 1,0 ml und 5,0 ml;
- sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 oder 100 mm;
- sterile Verdünnungslösung; z.B. destilliertes Wasser (für Agar) gemäß ISO 3696;
- physiologische Kochsalzlösung (zum Abwaschen und Verdünnen der Hefekulturen);
- Waage;
- Pipette und 0,1 cm³ sterile Spitzen;
- Bunsenbrenner;
- Brutschrank, thermostatisierbar (30 +/- 2°C);
- Autoklav;
- sterile Impfösen oder Impfnadeln;
- sterile Spatel;
- sterile Nährmedien für die entsprechenden Mikroorganismen, Zusammensetzung und Herstellung;
- pH-Messgerät;
- Reagenzgläser;
- Hefe-Stammkulturen;
- Reagenzglasständer;
- Reagenzglasschüttler
- Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)
- Mikroskop

4. Prüfororganismen

Die folgenden Hefen sollten für den Keimbelastungstest herangezogen werden:

Hefen:

<i>Candida boidinii</i>	BAM 649
<i>Candida lipolytica</i>	BAM 641
<i>Candida valida</i>	BAM 643

Weitere Keime, die ständig wiederkehrend zu Infektionen führen, können zusätzlich für eine separate Impfsuspension herangezogen werden. Bei diesen Organismen, die als Reinkulturen vorliegen müssen, soll eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen werden, wodurch der verwendete Hefestamm eindeutig bestimmt werden kann. Die Organismen sollen bei einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt werden.

5. Methode

Zu Beginn der Versuche erfolgt eine Eingangskontrolle der zu testenden Materialien. Hierzu wird die Farbe mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Geprüft werden müssen ungealterte Proben als auch künstlich gealterte Proben (s. 5.2). In beiden Fällen muss das Pass/Fail-Kriterium (s. 5.5) erreicht werden.

5.1 Impfsuspensionen-Zubereitung

5.1.1 Die Prüfororganismen werden von einer Dauerkultur (z.B. Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert *.

- 5.1.2** Die Hefen werden von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur) und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert*. Ausschließlich diese Kulturen werden für den Belastungstest eingesetzt.
- 5.1.3** Es werden getrennte Suspensionen von jedem Hefestamm zubereitet. Hierzu wird die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung, z.B. physiologische Kochsalzlösung, benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen.
- 5.1.4** Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wird mittels einer geeigneten Zählkammer ermittelt (z. B. Thoma-Kammer, Kammertiefe 0,02 mm). Die Zellzahl der einzelnen Hefesuspensionen soll

1*10⁸ - 5 *10⁸ KBE/ml

betragen.

Die vorbereitete Impfsuspension muss noch am gleichen Tag verwendet werden und sollte bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

- 5.1.5** Zur Herstellung der Mischsuspension werden gleiche Volumina jeder einzelnen Hefesuspension gemischt. Die Zellzahl soll dann ebenso

1*10⁸ - 5 *10⁸ KBE/ml

betragen.

- 5.1.6** Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wird durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe der Mischkultur auf CASO-Agar und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten kontrolliert.

* Sollten separat auch hauseigene Prüfstämme verwendet werden, so kann die Inkubationszeit für diese Keime nach Bedarf angepasst werden. Die geänderten Parameter für die Prüfung mit hauseigenen Keimen müssen im Prüfbericht vermerkt werden.

5.2 Künstliche Alterung

- 5.2.1** Das Biozidprodukt wird in geeigneten Konzentrationsreihen der Dispersionsfarbe hinzugefügt, die Proben kräftig gemischt und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert.
- 5.2.2** Es werden geeignete Anteile (z.B. 50 g oder 100 g) der Dispersionsfarbe in sterile Schraubgefäße eingewogen und diese fest verschlossen.
- 5.2.3** Zusätzlich dienen sechs unkonservierte Proben als Kontrollen. Hiervon werden drei Proben mit Bakterien beimpft (Positivkontrolle), die anderen drei Proben bleiben unbeimpft (Negativkontrolle, bzw. Rückstellmuster).
- 5.2.4** Die Proben werden für 4 Wochen bei 40 °C ± 2 °C oder alternativ für 18 Wochen bei 30 °C ± 2 °C gelagert.
- 5.2.5** Nach 4-bzw. 18-wöchiger Alterung wird der Keimbelastungstest wie unter 5.3 beschrieben durchgeführt.

5.3 Keimbelastungstest

- 5.3.1** Jede Probe (mit Ausnahme der Negativkontrolle) wird mit gleichem Volumen der Mischsuspension äquivalent zu 1,0% des Probengewichtes beimpft. Die Probe wird mit einem sterilen Spatel gut vermischt und die Schraubgefäße anschließend so verschlossen, dass ein Sauerstoffzutritt in das Gefäß gewährleistet ist.

- 5.3.2** Zur Bestimmung der mikrobiellen Anfangsbelastung aller Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Anschließend sind die Platten bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ für max. 3 Tage zu bebrüten*. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wird mittels eines geeigneten Verfahrens quantitativ ermittelt.
- 5.3.3** Zur Kontrolle der Vitalität der verwendeten Hefen wird die Mischsuspension wie unter 5.3.2 beschrieben angesetzt und ausgezählt.
- 5.3.4** Alle Proben werden für 7 Tage bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ inkubiert.
- 5.3.5** Zur Bestimmung der Keimzahl in den Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Nach dem Bebrüten der Platten bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ für max. 3 Tage * sind die koloniebildenden Einheiten zu ermitteln.
- 5.3.6** Die Schritte 5.3.1 bis 5.3.5 werden in wöchentlichen Intervallen wiederholt, bis insgesamt 3 Impfzyklen durchgeführt sind. Nach insgesamt 6 Wochen Inkubation bei $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ist der Test beendet und es wird eine abschließende Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vorgenommen.
- 5.3.7** Zur Differenzierung der Wirksamkeit verschiedener Biozidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer können zusätzliche Keimzahlbestimmungen, z.B. nach 1 und 3 Tagen nach Beimpfung, durchgeführt werden.

5.4 Validität der Prüfung

Die Prüfung ist valide, wenn die Wachstumsfähigkeit des Inokulums auf PDA-Agar in Petrischalen nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 5.1.6).

5.5 Pass./ Fail Kriterien

- 5.5.1** Die kurative Wirkung des Biozids in der Farbe durch die eingesetzte Biozidkonzentration ist gegeben, wenn nach Ablauf des Tests die Keimzahl $< 1000\text{ KBE/ml}$ ist.
- 5.5.2** Die Wirksamkeit eines zu prüfenden Biozids kann nicht nachgewiesen werden, wenn in der biozidfreien Farbe nach Beimpfung und Ablauf des Tests die Keimzahl $< 1000\text{ KBE/ml}$ ist.

5.6 Nachweis signifikanter Unterschiede

Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden, die signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen in den mit Topfkonservierern behandelten Proben und den unbehandelten Proben ggf. nachweisen können.

Nährmedium PD-Agar

Das Medium setzt sich aus 0,4 % Kartoffel-Infus, 2 % Glucose und 1,5 % Agar zusammen. Der pH liegt bei $5,6 \pm 0,2$. Um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien zu unterdrücken, wurde dem PDA-Nährmedium Chloramphenicol in einer finalen Konzentration von $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ zugegeben.

Zubereitung

40 g Nähragar sind in 1 L destillierten Wasser zu suspendieren, bis zum vollständigen Lösen zu rühren und 15 Minuten bei 121 °C zu autoklavieren.

8.3 Anlage 4c zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 "Emissionsarme Innenwandfarben"

Durchführung eines Biotests mit Schimmelpilzen

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Biozidprodukt* ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest nach folgendem Verfahren durchzuführen:

Eine Labormethode zur Ermittlung der erforderlichen Konzentration eines Biozidprodukts gegen Bakterien in emissionsarmen Innenwandfarben gemäß DE-UZ 102

1. Geltungsbereich

Die Methode kann angewendet werden, um die Wirksamkeit von Biozidprodukten bezüglich der Verhinderung des Wachstums und des Überlebens von Schadorganismen in wässrigen, polymerbasierenden, emissionsarmen Innenwandfarben zu prüfen. Dieses Verfahren wird analog zur Aufnahme von Biozidprodukten in den Anhang 1 der Vergabegrundlage DE-UZ 102 „Emissionsarme Wandfarben“ und beim Nachweis der Eignung für andere Gemische angewendet.

2. Gesundheitshinweis

Nationale Gesundheitsvorschriften müssen bei der Versuchsdurchführung beachtet werden. Gleiches gilt für die EG Richtlinie 200/54/EG 'Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit'. Bei der Handhabung von Dispersionsfarben und Bioziden sind die Angaben in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern und Produktinformationen für den sicheren Umgang mit diesen Produkten zu beachten.

*Produkttyp 6 gemäß der Biozidprodukteverordnung (EU Nr. 528/2012)

3. Geräte und Nährmedien

- geeignete sterile Schraubgefäße (100ml);
- sterile Pipetten, Nennvolumen 1,0 ml und 5,0 ml;
- sterile Pipettenspitzen;
- sterile Zentrifugenbecher (35 ml);
- sterile Filternutschen Größe 1;
- sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 oder 100 mm;
- sterile Verdünnungslösung; z.B. destilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösung;
- sterile Benetzungsmittel-Lösung;
- Waage;
- Brutschrank, thermostatisierbar (30 ± 2 °C);
- Autoklav;
- Trockenschrank;
- sterile Wattestäbe;
- sterile Impfösen oder Impfnadeln;
- Reagenzglasständer;
- Reagenzgläser;
- Reagenzglasschüttler;
- Zentrifuge;
- Sicherheitswerkbank Klasse 2;
- sterile Nährmedien für die entsprechenden Pilzkulturen, Zusammensetzung und Herstellung;

- Pilz-Stammkulturen;
- Zählkammer (0,1 mm Tiefe);
- Mikroskop;

4. Prüforganismen

Die folgenden Schimmelpilze sollten für den Keimbelastungstest herangezogen werden:

Schimmelpilze:

<i>Aspergillus oryzae</i>	BAM 613, NBRC 100959
<i>Paecilomyces variotii</i>	BAM 19, DSM 1961, ATCC 18502
<i>Penicillium ochrochloron</i>	BAM 25, DSM 1945

Weitere Keime, die ständig wiederkehrend zu Infektionen führen, können zusätzlich für eine separate Sporensuspension herangezogen werden. Bei diesen Organismen, die als Reinkulturen vorliegen müssen, soll eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen werden, wodurch der verwendete Stamm eindeutig bestimmt werden kann. Die Organismen sollen bei einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt werden.

5. Methode

Zu Beginn der Versuche erfolgt eine Eingangskontrolle der zu testenden Materialien. Hierzu wird die Farbe mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Geprüft werden müssen ungealterte Proben als auch künstlich gealterte Proben (s. 5.2). In beiden Fällen muss das Pass/Fail-Kriterium (s. 5.5) erreicht werden.

5.1 Sporensuspension-Zubereitung

- 5.1.1 Die Prüfpilze werden ca. 14 Tage vor Ansatz der Prüfung auf Nähragarplatten überimpft. Benötigte Geräte und Flüssigkeiten werden bei 121°C für 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert.
- 5.1.2 Unter sterilen Bedingungen werden die Reagenzgläser mit 10 ml Benetzungsmittel-Lösung gefüllt und ein Wattestab mit dieser Lösung befeuchtet. Das Sporenmateriale wird anschließend mit dem Wattestab von der Nähragarplatte abgestrichen und durch Reiben an der Reagenzglaswand in die befüllten Reagenzgläser überführt. Der gesamte Ansatz wird mittels Reagenzglasschüttler durchmischt.
- 5.1.3 Der Ansatz wird erneut geschüttelt und anschließend durch eine Filternutsche in einen Zentrifugenbecher gegossen. Bei schwach sporulierenden Pilzkulturen sind weitere Sporen aus zusätzlichen Nähragarplatten zu gewinnen. Für jeden Pilz muss eine separate Filternutsche sowie ein separater Zentrifugenbecher verwendet werden.
- 5.1.4 Die Suspensionen werden für 10 Minuten bei 3 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgenommen. Der Bodensatz wird mit 10 ml sterilem, demineralisiertem Wasser gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.
- 5.1.5 Der Vorgang wird wie unter 5.1.4 beschrieben zweimal wiederholt, so dass die Sporen insgesamt dreimal gewaschen werden.
- 5.1.6 Der Bodensatz wird in 3-5 ml sterilem, demineralisiertem Wasser aufgenommen und die Konzentration der Sporen mit einer geeigneten Zählkammer bestimmt (z.B. Thoma-Kammer, Kammertiefe 0,1 mm).

5.1.7 Die Sporenzahl der einzelnen Sporensuspensionen soll

$8 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^6$ Sporen/ml

betragen. Die vorbereitete Sporensuspension sollte bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.1.8 Zur Herstellung der Mischsuspension werden gleiche Volumina jeder einzelnen Sporensuspension zusammengegeben und gemischt. Die Sporensuspension sollte dann ebenfalls

$8 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^6$ Sporen/ml

betragen.

5.1.9 Die Vitalität der Schimmelpilze wird durch Ausstreichen der Sporensuspension auf PDA-Platten überprüft. Die Platten werden für maximal 7 Tage bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ bebrütet.

5.2 Künstliche Alterung

5.2.1 Das Biozidprodukt wird in geeigneten Konzentrationsreihen der Dispersionsfarbe hinzugefügt, die Proben kräftig gemischt und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.2 Es werden geeignete Anteile (z.B. 50 g oder 100 g) der Dispersionsfarbe in sterile Schraubgefäße eingewogen und diese fest verschlossen.

5.2.3 Zusätzlich dienen sechs unkonservierte Proben als Kontrollen. Hiervon werden drei Proben mit Bakterien beimpft (Positivkontrolle), die anderen drei Proben bleiben unbeimpft (Negativkontrolle, bzw. Rückstellmuster).

5.2.4 Die Proben werden für 4 Wochen bei $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ oder alternativ für 18 Wochen bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ gelagert.

5.2.5 Nach 4- bzw. 18-wöchiger Alterung wird der Keimbelastungstest wie unter 5.3 beschrieben durchgeführt.

5.3 Keimbelastungstest

5.3.1 Jede Probe (mit Ausnahme der Negativkontrolle) wird mit gleichem Volumen der Sporensuspension äquivalent zu 1,0% des Probengewichtes beimpft. Die Sporensuspension wird dabei durch vorsichtiges Schwenken der Probe homogen auf der Oberfläche der Probe verteilt. Die Schraubgefäße werden anschließend so verschlossen, dass ein Sauerstoffzutritt in das Gefäß gewährleistet ist.

5.3.3 Zur Kontrolle der Vitalität der Schimmelpilze wird die Sporensuspension auf Nähragarplatten und die Platten für maximal 7 Tage bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert.

5.3.4 Alle Proben werden für 7 Tage bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert.

5.3.5 Das Oberflächenwachstum der Schimmelpilze wird visuell überprüft.

0: kein Bewuchs

1: schwaches Wachstum (bis zu 10 % der Oberfläche bedeckt)

2: mittleres Wachstum (bis zu 30 % der Oberfläche bedeckt)

3: starkes Wachstum (bis zu 70 % der Oberfläche bedeckt)

4: vollständiges Wachstum (bis zu 100 % der Oberfläche bedeckt)

5.3.6 Die Schritte 5.3.1 bis 5.3.4 werden in wöchentlichen Intervallen wiederholt, bis insgesamt 3 Impfyklen durchgeführt sind. Nach insgesamt 6 Wochen Inkubation bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ist der Test beendet und es wird eine abschließende visuelle Bewertung der Proben vorgenommen.

5.3.7 Zur Differenzierung der Wirksamkeit verschiedener Biozidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer können zusätzliche Keimzahlbestimmungen, z.B. nach 1 und 3 Tagen nach Beimpfung, durchgeführt werden.

5.4 Validität der Prüfung

Die Prüfung ist valide, wenn die Wachstumsfähigkeit der Schimmelpilze auf PDA-Agar in Petrischalen nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 5.1.9).

5.5 Pass./ Fail Kriterien

5.5.1 Die kurative Wirkung des Biozids in der Farbe durch die eingesetzte Biozidkonzentration ist gegeben, wenn nach Ablauf des Tests keine Ausbildung von Schimmel beobachtet werden kann.

5.5.2 Die Wirksamkeit eines zu prüfenden Biozids kann nicht nachgewiesen werden, wenn in der biozidfreien Farbe nach Beimpfung und Ablauf des Tests keine Schimmelbildung nachgewiesen werden kann.

5.6 Nachweis signifikanter Unterschiede

Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden, die signifikante Unterschiede zwischen den mit Topfkonservierern behandelten Proben und den unbehandelten Proben ggf. nachweisen können.

Nährmedium PD-Agar

Das Medium setzt sich aus 0,4 % Kartoffel-Infus, 2 % Glucose und 1,5 % Agar zusammen. Der pH liegt bei $5,6 \pm 0,2$. Um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien zu unterdrücken, wurde dem PDA-Nährmedium Chloramphenicol in einer finalen Konzentration von 30 µg/ml zugegeben.

Zubereitung

40 g Nähragar sind in 1 L destillierten Wasser zu suspendieren, bis zum vollständigen Lösen zu rühren und 15 Minuten bei 121°C zu autoklavieren.

8.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheit in Dispersionsfarben

Tabelle 49: Belastungstest Bakterien in VAE-haltiger Farbe

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	8,33*10 ³	10 ³	9,03*10 ⁶	
		8,71*10 ³	10 ³		
		1,00*10 ⁴	10 ³		
Farbe 1_2	0	1,06*10 ⁴	10 ³	1,03*10 ⁷	
		1,00*10 ⁴	10 ³		
		1,02*10 ⁴	10 ³		
Farbe 1_3	0	1,02*10 ⁴	10 ³	1,01*10 ⁷	9,64*10 ⁶ ± 5,49*10 ⁵
		1,08*10 ⁴	10 ³		
		9,28*10 ³	10 ³		
Farbe 1_4	0	8,52*10 ³	10 ³	9,22*10 ⁶	
		9,28*10 ³	10 ³		
		9,85*10 ³	10 ³		
Farbe 1_5	0	9,85*10 ³	10 ³	9,53*10 ⁶	
		9,28*10 ³	10 ³		
		9,47*10 ³	10 ³		
Farbe 2_1	0	9,47*10 ³	10 ³	8,65*10 ⁶	
		7,77*10 ³	10 ³		
		8,71*10 ³	10 ³		
Farbe 2_2	0	1,14*10 ⁴	10 ³	1,06*10 ⁷	
		8,52*10 ³	10 ³		
		1,19*10 ⁴	10 ³		
Farbe 2_3	0	8,14*10 ³	10 ³	8,59*10 ⁶	9,81*10 ⁶ ± 1,19*10 ⁶
		8,33*10 ³	10 ³		
		9,28*10 ³	10 ³		
Farbe 2_4	0	1,04*10 ⁴	10 ³	1,13*10 ⁷	
		1,17*10 ⁴	10 ³		
		1,16*10 ⁴	10 ³		
Farbe 2_5	0	1,19*10 ⁴	10 ³	9,91*10 ⁶	
		1,00*10 ⁴	10 ³		
		7,77*10 ³	10 ³		
Farbe 3_1	0	1,12*10 ⁴	10 ³	9,66*10 ⁶	
		9,09*10 ³	10 ³		
		8,71*10 ³	10 ³		
Farbe 3_2	0	9,66*10 ³	10 ³	9,28*10 ⁶	
		8,52*10 ³	10 ³		
		9,66*10 ³	10 ³		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 3_3	0	8,14*10 ³ 1,21*10 ⁴ 9,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,96*10 ⁶	1,03*10 ⁷ ± 8,19*10 ⁵
Farbe 3_4	0	8,90*10 ³ 1,12*10 ⁴ 1,14*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,05*10 ⁷	
Farbe 3_5	0	1,06*10 ⁴ 9,66*10 ³ 1,10*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,04*10 ⁷	
Farbe 4_1	0	1,31*10 ⁴ 9,85*10 ³ 8,71*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,05*10 ⁷	
Farbe 4_2	0	9,66*10 ³ 9,66*10 ³ 1,00*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,79*10 ⁶	
Farbe 4_3	0	9,47*10 ³ 1,16*10 ⁴ 1,08*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,06*10 ⁷	1,01*10 ⁷ ± 4,38*10 ⁵
Farbe 4_4	0	1,23*10 ⁴ 8,33*10 ³ 9,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,00*10 ⁷	
Farbe 4_5	0	1,16*10 ⁴ 9,47*10 ³ 7,77*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,60*10 ⁶	
Mischung 1_1	0	9,85*10 ³ 9,47*10 ³ 9,85*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,72*10 ⁶	
Mischung 1_2	0	1,10*10 ⁴ 9,66*10 ³ 8,52*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,72*10 ⁶	
Mischung 1_3	0	1,00*10 ⁴ 9,85*10 ³ 8,90*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,60*10 ⁶	1,01*10 ⁷ ± 6,14*10 ⁵
Mischung 1_4	0	1,02*10 ⁴ 1,21*10 ⁴ 1,06*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,10*10 ⁷	
Mischung 1_5	0	1,08*10 ⁴ 1,14*10 ⁴ 9,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,05*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 2_1	0	7,77*10 ³ 1,17*10 ⁴ 1,06*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,00*10 ⁷	
Mischung 2_2	0	1,00*10 ⁴ 9,47*10 ³ 9,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,66*10 ⁶	
Mischung 2_3	0	9,47*10 ³ 1,02*10 ⁴ 1,00*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,91*10 ⁶	9,92*10 ⁶ ± 5,78*10 ⁵
Mischung 2_4	0	1,00*10 ⁴ 9,47*10 ³ 8,14*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,22*10 ⁶	
Mischung 2_5	0	1,00*10 ⁴ 1,00*10 ⁴ 1,23*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,08*10 ⁷	
Farbe 1_1	1	1,22*10 ⁵ 1,07*10 ⁵ 1,30*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,20*10 ⁸	
Farbe 1_2	1	9,07*10 ⁴ 1,06*10 ⁵ 1,15*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,04*10 ⁸	
Farbe 1_3	1	9,81*10 ⁴ 1,07*10 ⁵ 1,08*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,05*10 ⁸	1,12*10 ⁸ ± 1,44*10 ⁷
Farbe 1_4	1	1,25*10 ⁵ 1,40*10 ⁵ 1,34*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,33*10 ⁸	
Farbe 1_5	1	7,59*10 ⁴ 1,05*10 ⁵ 1,12*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,75*10 ⁷	
Farbe 2_1	2	6,39*10 ⁴ 6,85*10 ⁴ 7,22*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,82*10 ⁷	
Farbe 2_2	2	5,93*10 ⁴ 5,93*10 ⁴ 5,50*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,80*10 ⁷	
Farbe 2_3	2	5,56*10 ⁴ 4,81*10 ⁴ 6,02*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,46*10 ⁷	6,05*10 ⁷ ± 5,79*10 ⁶
Farbe 2_4	2	6,20*10 ⁴ 6,02*10 ⁴ nd	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,11*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_5	2	6,24*10 ³ 7,11*10 ³ nd	10 ³ 10 ³	6,67*10 ⁶	
Farbe 2_1	3	1,12*10 ⁵ 1,09*10 ⁵ 1,06*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,12*10 ⁸	
Farbe 2_2	3	9,24*10 ⁴ 8,52*10 ⁴ 1,27*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,02*10 ⁸	
Farbe 2_3	3	1,31*10 ⁵ 1,20*10 ⁵ 1,09*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,20*10 ⁸	1,09*10 ⁸ ± 1,26*10 ⁷
Farbe 2_4	3	1,26*10 ⁵ 1,15*10 ⁵ 1,11*10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,20*10 ⁸	
Farbe 2_5	3	8,70*10 ⁴ 9,44*10 ⁴ 9,72*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,07*10 ⁷	
Mischung 1_1	4	9,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,67*10 ⁴	
Mischung 1_2	4	9,00*10 ¹ 6,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,00*10 ⁴	
Mischung 1_3	4	1,00*10 ² 9,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,33*10 ⁴	8,67*10 ⁴ ± 5,27*10 ³
Mischung 1_4	4	1,1*10 ² 6,00*10 ¹ 1,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,00*10 ⁴	
Mischung 1_5	4	9,00*10 ¹ 9,00*10 ¹ 1,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,33*10 ⁴	
Mischung 1_1	5	5,80*10 ² 7,00*10 ² 7,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,87*10 ⁵	
Mischung 1_2	5	4,80*10 ² 1,39*10 ³ nd	10 ³ 10 ³	6,23*10 ⁵	
Mischung 1_3	5	4,90*10 ² 5,50*10 ² 6,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,53*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_4	5	6,80*10 ² 5,50*10 ² 7,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,53*10 ⁵	6,49*10 ⁵ ± 6,60*10 ⁴
Mischung 1_5	5	7,90*10 ² 8,30*10 ² 5,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,27*10 ⁵	
Mischung 1_1	6	3,17*10 ³ 3,46*10 ³ 3,08*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,24*10 ⁶	
Mischung 1_2	6	3,23*10 ³ 3,34*10 ³ 3,41*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,39*10 ⁶	
Mischung 1_3	6	3,98*10 ³ 4,02*10 ³ 3,70*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,90*10 ⁶	3,34*10 ⁶ ± 3,43*10 ⁵
Mischung 1_4	6	2,91*10 ³ 2,87*10 ³ 3,11*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,96*10 ⁶	
Mischung 1_5	6	4,36*10 ³ 5,49*10 ³ nd	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,26*10 ⁶	

Tabelle 50: Belastungstest Bakterien in VAE-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	6,78*10 ³ 6,48*10 ³ 5,48*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,24*10 ⁶	
Farbe 1_2	0	2,01*10 ⁴ 4,91*10 ⁴ 5,00*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,97*10 ⁷	
Farbe 1_3	0	4,81*10 ³ 5,14*10 ³ 5,36*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,11*10 ⁶	6,23*10 ⁶ ± 2,14*10 ⁶
Farbe 1_4	0	5,69*10 ³ 3,27*10 ³ 4,07*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,34*10 ⁶	
Farbe 1_5	0	9,85*10 ³ 8,33*10 ³ 9,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,22*10 ⁶	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_1	0	1,06*10 ⁴ 1,06*10 ⁴ 1,10*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,07*10 ⁷	
Farbe 2_2	0	9,09*10 ³ 6,13*10 ³ 5,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,90*10 ⁶	
Farbe 2_3	0	6,13*10 ³ 6,13*10 ³ 5,80*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,02*10 ⁶	1,07*10 ⁷ ± 4,41*10 ⁶
Farbe 2_4	0	1,64*10 ⁴ 1,72*10 ⁴ 1,61*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,65*10 ⁷	
Farbe 2_5	0	1,72*10 ⁴ 1,10*10 ⁴ 1,23*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,35*10 ⁷	
Farbe 3_1	0	1,12*10 ⁴ 9,09*10 ³ 8,71*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,66*10 ⁶	
Farbe 3_2	0	1,08*10 ⁴ 1,00*10 ⁴ 9,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,01*10 ⁷	
Farbe 3_3	0	5,91*10 ³ 5,47*10 ³ 4,81*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,40*10 ⁶	8,07*10 ⁶ ± 2,10*10 ⁶
Farbe 3_4	0	6,02*10 ³ 6,67*10 ³ 6,13*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,27*10 ⁶	
Farbe 3_5	0	7,88*10 ³ 9,63*10 ³ 9,19*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,90*10 ⁶	
Farbe 4_1	0	5,69*10 ³ 4,92*10 ³ 4,81*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,14*10 ⁶	
Farbe 4_2	0	8,33*10 ³ 8,14*10 ³ 5,36*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,28*10 ⁶	
Farbe 4_3	0	1,04*10 ⁴ 1,14*10 ⁴ 9,66*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,05*10 ⁷	7,50*10 ⁶ ± 2,76*10 ⁶
Farbe 4_4	0	1,00*10 ⁴ 1,17*10 ⁴ 8,52*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,01*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 4_5	0	1,83*10 ³ 6,35*10 ³ 5,25*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,48*10 ⁶	
Mischung 1_1	0	2,35*10 ³ 2,33*10 ³ 2,48*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,39*10 ⁶	
Mischung 1_2	0	1,10*10 ⁴ 9,28*10 ³ 9,09*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,79*10 ⁶	
Mischung 1_3	0	1,06*10 ⁴ 9,28*10 ³ 8,90*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,60*10 ⁶	9,32*10 ⁶ ± 1,05*10 ⁶
Mischung 1_4	0	8,32*10 ³ 7,11*10 ³ 7,88*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,77*10 ⁶	
Mischung 1_5	0	1,06*10 ⁴ 1,12*10 ⁴ 8,52*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,01*10 ⁷	
Mischung 2_1	0	2,25*10 ³ 2,22*10 ³ 2,25*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,25*10 ⁶	
Mischung 2_2	0	3,40*10 ³ 3,20*10 ³ 2,94*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,18*10 ⁶	
Mischung 2_3	0	6,24*10 ³ 6,13*10 ³ 5,58*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,98*10 ⁶	3,60*10 ⁶ ± 1,40*10 ⁶
Mischung 2_4	0	3,20*10 ³ 3,47*10 ³ 3,13*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,27*10 ⁶	
Mischung 2_5	0	5,47*10 ³ 2,48*10 ³ 2,03*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁶	
Farbe 1_1	2	1,64*10 ⁴ 1,90*10 ⁴ 1,79*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,78*10 ⁸	
Farbe 1_2	2	9,26*10 ⁴ 9,91*10 ⁴ 9,63*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	9,60*10 ⁸	
Farbe 1_3	2	2,30*10 ⁴ 2,19*10 ⁴ 2,37*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,29*10 ⁸	1,79*10 ⁸ ± 5,34*10 ⁷

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_4	2	2,23*10 ⁴ 1,90*10 ⁴ 1,97*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,03*10 ⁸	
Farbe 1_5	2	8,64*10 ³ 1,10*10 ⁴ 1,19*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,05*10 ⁸	
Farbe 1_1	3	6,76*10 ⁴ 7,31*10 ⁴ 5,83*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,64*10 ⁸	
Farbe 1_2	3	5,74*10 ⁴ 5,46*10 ⁴ 5,00*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,40*10 ⁸	
Farbe 1_3	3	5,28*10 ⁴ 5,19*10 ⁴ 4,35*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,94*10 ⁸	5,53*10 ⁸ ± 7,67*10 ⁷
Farbe 1_4	3	5,64*10 ⁴ 4,91*10 ⁴ 4,81*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,12*10 ⁸	
Farbe 1_5	3	3,14*10 ⁴ 2,99*10 ⁴ 2,59*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,91*10 ⁸	
Farbe 1_1	4	4,07*10 ⁴ 4,17*10 ⁴ 3,98*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,07*10 ⁸	
Farbe 1_2	4	1,97*10 ⁴ 2,48*10 ⁴ 2,77*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,41*10 ⁸	
Farbe 1_3	4	2,63*10 ⁴ 2,34*10 ⁴ 2,59*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,52*10 ⁸	3,01*10 ⁸ ± 7,58*10 ⁷
Farbe 1_4	4	2,66*10 ⁴ 3,32*10 ⁴ 3,07*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	3,02*10 ⁸	
Farbe 1_5	4	3,58*10 ³ 3,60*10 ³ 3,86*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	3,68*10 ⁷	
Farbe 1_1	5	1,00*10 ⁴ 9,19*10 ³ 9,52*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	9,58*10 ⁷	
Farbe 1_2	5	9,66*10 ³ 9,47*10 ³ 1,08*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	9,97*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_3	5	2,26*10 ⁴	10 ⁴	2,31*10 ⁸	1,41*10 ⁸ ± 6,15*10 ⁷
		2,48*10 ⁴	10 ⁴		
		2,19*10 ⁴	10 ⁴		
Farbe 1_4	5	9,28*10 ³	10 ⁴	9,97*10 ⁷	
		9,66*10 ³	10 ⁴		
		1,10*10 ⁴	10 ⁴		
Farbe 1_5	5	1,57*10 ⁴	10 ⁴	1,81*10 ⁸	
		1,79*10 ⁴	10 ⁴		
		2,08*10 ⁴	10 ⁴		
Farbe 1_1	6	1,12*10 ⁴	10 ⁴	1,29*10 ⁸	
		1,42*10 ⁴	10 ⁴		
		1,33*10 ⁴	10 ⁴		
Farbe 1_2	6	1,53*10 ⁴	10 ⁴	1,43*10 ⁸	
		1,44*10 ⁴	10 ⁴		
		1,33*10 ⁴	10 ⁴		
Farbe 1_3	6	1,33*10 ⁴	10 ⁴	1,01*10 ⁸	1,19*10 ⁸ ± 2,07*10 ⁷
		8,32*10 ³	10 ⁴		
		8,75*10 ³	10 ⁴		
Farbe 1_4	6	1,00*10 ⁴	10 ⁴	1,03*10 ⁸	
		1,08*10 ⁴	10 ⁴		
		1,00*10 ⁴	10 ⁴		
Farbe 1_5	6	3,18*10 ⁴	10 ⁴	3,60*10 ⁸	
		4,44*10 ⁴	10 ⁴		
		3,18*10 ⁴	10 ⁴		

Tabelle 51: Belastungstest Hefen in VAE-haltiger Farbe

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	4,00*10 ¹	10 ⁴	5,00*10 ⁵	
		5,00*10 ¹	10 ⁴		
		6,00*10 ¹	10 ⁴		
Farbe 1_2	0	7,00*10 ¹	10 ⁴	5,67*10 ⁵	
		5,00*10 ¹	10 ⁴		
		5,00*10 ¹	10 ⁴		
Farbe 1_3	0	5,00*10 ¹	10 ⁴	6,00*10 ⁵	5,73*10 ⁵ ± 4,35*10 ⁴
		5,00*10 ¹	10 ⁴		
		8,00*10 ¹	10 ⁴		
Farbe 1_4	0	4,00*10 ¹	10 ⁴	5,33*10 ⁵	
		5,00*10 ¹	10 ⁴		
		7,00*10 ¹	10 ⁴		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_5	0	7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,33*10 ⁵	
Farbe 2_1	0	4,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,33*10 ⁵	
Farbe 2_2	0	9,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,67*10 ⁵	
Farbe 2_3	0	5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,33*10 ⁵	6,00*10 ⁵ ± 5,28*10 ⁴
Farbe 2_4	0	5,00*10 ¹ 3,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,67*10 ⁵	
Farbe 2_5	0	7,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 1,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,00*10 ⁵	
Farbe 3_1	0	5,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,33*10 ⁵	
Farbe 3_2	0	7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 3,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,00*10 ⁵	
Farbe 3_3	0	1,00*10 ² 4,00*10 ¹ 3,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,67*10 ⁵	5,67*10 ⁵ ± 5,27*10 ⁴
Farbe 3_4	0	7,00*10 ¹ 4,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,33*10 ⁵	
Farbe 3_5	0	6,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,00*10 ⁵	
Farbe 4_1	0	4,00*10 ² 7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,33*10 ⁵	
Farbe 4_2	0	8,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,67*10 ⁵	
Farbe 4_3	0	3,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,67*10 ⁵	5,33*10 ⁵ ± 8,17*10 ⁴

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 4_4	0	2,00*10 ² 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,33*10 ⁵	
Farbe 4_5		6,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,67*10 ⁵	
Mischung 1_1	0	5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,33*10 ⁵	
Mischung 1_2	0	3,00*10 ¹ 6,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,00*10 ⁵	
Mischung 1_3	0	5,00*10 ² 7,00*10 ¹ 8,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,67*10 ⁵	5,75*10 ⁵ ± 7,41*10 ⁴
Mischung 1_4	0	1,00*10 ¹ 0,00 0,00	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,00*10 ⁵	
Mischung 1_5	0	6,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,00*10 ⁵	
Mischung 2_1	0	8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	7,00*10 ⁵	
Mischung 2_2	0	5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,33*10 ⁵	
Mischung 2_3	0	7,00*10 ² 6,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,67*10 ⁵	5,80*10 ⁵ ± 7,68*10 ⁴
Mischung 2_4	0	2,00*10 ² 5,00*10 ¹ 8,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,00*10 ⁵	
Mischung 2_5	0	7,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 3,00*10 ¹	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	6,00*10 ⁵	
Farbe 1_1	1	1,06*10 ³ 6,40*10 ² 3,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,70*10 ⁵	
Farbe 1_2	1	7,10*10 ² 7,70*10 ² 6,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,20*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_3	1	9,30*10 ² 8,50*10 ² 6,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,17*10 ⁵	7,15*10 ⁵ ± 6,66*10 ⁴
Farbe 1_4	1	6,30*10 ² 7,10*10 ² 5,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,43*10 ⁵	
Farbe 1_5	1	6,10*10 ² 8,20*10 ² 7,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,20*10 ⁵	
Farbe 2_1	1	6,00*10 ² 7,50*10 ² 5,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,43*10 ⁵	
Farbe 2_2	1	5,30*10 ² 6,80*10 ² 6,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,07*10 ⁵	
Farbe 2_3	1	7,50*10 ² 6,80*10 ² 5,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,60*10 ⁵	6,54*10 ⁵ ± 4,39*10 ⁴
Farbe 2_4	1	7,00*10 ² 8,50*10 ² 6,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,27*10 ⁵	
Farbe 2_5	1	5,50*10 ² 7,20*10 ² 6,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,37*10 ⁵	
Farbe 1_1	2	3,48*10 ³ 3,62*10 ³ 3,21*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,44*10 ⁶	
Farbe 1_2	2	2,12*10 ³ 2,23*10 ³ 3,12*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,49*10 ⁶	
Farbe 1_3	2	3,27*10 ³ 2,66*10 ³ 2,45*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,79*10 ⁶	2,72*10 ⁶ ± 6,09*10 ⁵
Farbe 1_4	2	1,51*10 ³ 1,90*10 ³ 2,07*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,83*10 ⁶	
Farbe 1_5	2	2,95*10 ³ 3,16*10 ³ 3,06*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,06*10 ⁶	
Farbe 2_1	2	2,45*10 ³ 2,87*10 ³ 2,37*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,56*10 ⁶	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_2	2	2,42*10 ³ 2,38*10 ³ 2,37*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,39*10 ⁶	
Farbe 2_3	2	1,79*10 ³ 1,77*10 ³ 1,83*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,80*10 ⁶	2,35*10 ⁶ ± 3,12*10 ⁵
Farbe 2_4	2	2,36*10 ³ 2,47*10 ³ 2,75*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,53*10 ⁶	
Farbe 2_5	2	2,31*10 ³ 2,47*10 ³ 2,56*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,45*10 ⁶	
Mischung 1_1	2	4,00*10 ¹ 3,00*10 ¹ 3,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁴	
Mischung 1_2	2	2,00*10 ² 3,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁴	
Mischung 1_3	2	3,00*10 ² 5,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,67*10 ⁴	3,60*10 ⁴ ± 7,24*10 ³
Mischung 1_4	2	3,00*10 ² 4,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,00*10 ⁴	
Mischung 1_5	2	3,00*10 ² 2,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁴	
Mischung 2_1	2	9,70*10 ² 1,00*10 ³ 9,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,70*10 ⁵	
Mischung 2_2	2	4,60*10 ² 3,90*10 ² 5,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,80*10 ⁵	
Mischung 2_3	2	3,50*10 ² 4,10*10 ² 5,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,20*10 ⁵	3,95*10 ⁵ ± 7,55*10 ⁴
Mischung 2_4	2	4,00*10 ² 3,00*10 ² 4,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,70*10 ⁵	
Mischung 2_5	2	3,00*10 ² 2,80*10 ² 3,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	3	1,02*10 ³ 1,34*10 ³ 8,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,07*10 ⁶	
Farbe 1_2	3	1,06*10 ³ 1,19*10 ³ 1,21*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,15*10 ⁶	
Farbe 1_3	3	9,20*10 ² 9,70*10 ² 1,30*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,06*10 ⁶	1,12*10 ⁶ ± 9,87*10 ⁴
Farbe 1_4	3	1,09*10 ³ 1,24*10 ³ 1,51*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,28*10 ⁶	
Farbe 1_5	3	9,20*10 ² 1,04*10 ³ 1,15*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,04*10 ⁶	
Farbe 2_1	3	1,75*10 ⁴ 1,64*10 ⁴ 1,57*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,65*10 ⁷	
Farbe 2_2	3	3,24*10 ³ 3,07*10 ³ 2,87*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,06*10 ⁶	
Farbe 2_3	3	3,27*10 ³ 2,97*10 ³ 2,75*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁶	3,60*10 ⁶ ± 6,29 *10 ⁵
Farbe 2_4	3	4,19*10 ³ 4,08*10 ³ 3,97*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,08*10 ⁶	
Farbe 2_5	3	4,20*10 ³ 4,13*10 ³ 4,30*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,45*10 ⁶	
Mischung 1_1	3	8,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,00*10 ⁴	
Mischung 1_3	3	9,00*10 ² 10,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,67*10 ⁴	7,92*10 ⁴ ± 5,71*10 ³
Mischung 1_4	3	1,00*10 ² 8,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33*10 ⁴	
Mischung 1_5	3	7,00*10 ² 9,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,67*10 ⁴	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 2_1	3	3,10*10 ² 3,70*10 ³ 3,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁵	
Mischung 2_2	3	4,30*10 ² 3,40*10 ² 3,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,67*10 ⁵	
Mischung 2_3	3	1,44*10 ³ 1,65*10 ³ 1,31*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,47*10 ⁶	3,39*10 ⁵ ± 7,19*10 ⁴
Mischung 2_4	3	4,50*10 ² 3,80*10 ² 4,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,13*10 ⁵	
Mischung 2_5	3	2,40*10 ² 2,70*10 ² 2,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,43*10 ⁵	
Farbe 1_1	4	6,30*10 ² 6,50*10 ² 8,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,00*10 ⁵	
Farbe 1_2	4	7,30*10 ² 6,50*10 ² 7,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,255*10 ⁵	
Farbe 1_3	4	4,50*10 ² 3,20*10 ² 5,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,47*10 ⁵	6,43*10 ⁵ ± 1,12*10 ⁵
Farbe 1_4	4	7,20*10 ² 5,90*10 ² 6,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,53*10 ⁵	
Farbe 1_5	4	7,70*10 ² 6,40*10 ² 6,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,97*10 ⁵	
Farbe 2_1	4	6,24*10 ³ 4,49*10 ³ 7,55*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,09*10 ⁶	
Farbe 2_2	4	4,92*10 ³ 5,69*10 ³ 4,49*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,03*10 ⁶	
Farbe 2_3	4	6,02*10 ³ 5,14*10 ³ 5,25*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,47*10 ⁶	5,27*10 ⁶ ± 6,67*10 ⁵
Farbe 2_4	4	1,23*10 ⁴ 1,27*10 ⁴ 1,14*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,21*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_5	4	5,69*10 ³ 4,70*10 ³ 4,60*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,00*10 ⁶	
Mischung 1_1	4	8,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,00*10 ⁴	
Mischung 1_2	4	1,30*10 ² 1,50*10 ² 2,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,73*10 ⁵	
Mischung 1_3	4	1,20*10 ² 1,60*10 ² 1,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,37 *10 ⁵	1,53*10 ⁵ ± 2,22*10 ⁴
Mischung 1_4	4	1,10*10 ² 1,90*10 ² 2,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,70*10 ⁵	
Mischung 1_5	4	1,10*10 ² 1,30 *10 ² 1,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,30*10 ⁵	
Mischung 2_1	4	2,10*10 ² 2,40*10 ² 2,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,27*10 ⁵	
Mischung 2_2	4	2,10*10 ² 2,30*10 ² 2,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,17*10 ⁵	
Mischung 2_3	4	2,60*10 ² 2,40*10 ² 2,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,47*10 ⁵	2,46*10 ⁵ ± 2,48*10 ⁴
Mischung 2_4	4	3,10*10 ² 2,50*10 ² 2,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,77*10 ⁵	
Mischung 2_5	4	2,10*10 ² 2,80*10 ² 3,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,63*10 ⁵	
Farbe 1_1	5	9,00*10 ¹ 1,00*10 ² 2,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,30*10 ⁵	
Farbe 1_2	5	2,00*10 ² 1,50*10 ² 2,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,07 *10 ⁵	
Farbe 1_3	5	4,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,00*10 ⁴	1,70*10 ⁵ ± 4,07*10 ⁴

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_4	5	1,60*10 ² 1,40*10 ² 1,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,40*10 ⁵	
Farbe 1_5	5	2,00*10 ² 1,700*10 ² 2,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,03*10 ⁵	
Farbe 2_1	5	4,51*10 ³ 4,63*10 ³ 4,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,54*10 ⁶	
Farbe 2_2	5	5,87*10 ³ 5,93*10 ³ 5,76*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,85*10 ⁶	
Farbe 2_3	5	5,10*10 ³ 9,47*10 ³ 5,25*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,61*10 ⁶	5,35*10 ⁶ ± 9,30*10 ⁵
Farbe 2_4	5	5,80*10 ³ 5,25*10 ³ 5,14*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,40*10 ⁶	
Farbe 2_5	5	4,30*10 ⁴ 4,05*10 ⁴ 4,75*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,37 *10 ⁷	
Mischung 1_1	5	1,00*10 ² 1,40*10 ² 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,10*10 ⁵	
Mischung 1_3	5	9,00*10 ¹ 9,00*10 ¹ 1,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,03 *10 ⁵	1,18*10 ⁵ ± 1,41*10 ⁴
Mischung 1_4	5	1,50*10 ² 1,10*10 ² 1,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,27*10 ⁵	
Mischung 1_5	5	1,70*10 ² 8,00 *10 ¹ 1,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,33*10 ⁵	
Mischung 2_1	5	2,90*10 ³ 3,05*10 ⁴ 3,32*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,22*10 ⁷	
Mischung 2_2	5	2,00*10 ² 2,70*10 ² 3,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,60*10 ⁵	
Mischung 2_3	5	1,70*10 ² 1,40*10 ² 1,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,67*10 ⁵	2,08*10 ⁵ ± 4,24*10 ⁴

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 2_4	5	2,10*10 ² 1,90*10 ² 2,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,23*10 ⁵	
Mischung 2_5	5	1,50*10 ² 2,20*10 ² 1,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,80*10 ⁵	
Farbe 1_1	6	1,30*10 ² 1,70*10 ² 2,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,67*10 ⁵	
Farbe 1_2	6	1,40*10 ² 1,80*10 ² 1,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,57 *10 ⁵	
Farbe 1_3	6	5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 3,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,00*10 ⁴	1,55*10 ⁵ ± 8,88*10 ³
Farbe 1_4	6	1,40*10 ² 1,90*10 ² 1,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,47 *10 ⁵	
Farbe 1_5	6	1,60*10 ² 1,60*10 ² 1,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,50 *10 ⁵	
Farbe 2_1	6	2,46*10 ³ 2,41*10 ³ 2,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,45*10 ⁶	
Farbe 2_2	6	3,28*10 ³ 3,38*10 ³ 3,51*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,39*10 ⁶	
Farbe 2_3	6	2,98*10 ³ 3,12*10 ³ 3,39*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,61*10 ⁶	2,79*10 ⁶ ± 4,63*10 ⁵
Farbe 2_4	6	2,66*10 ³ 2,73*10 ³ 1,58*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,32*10 ⁶	
Farbe 2_5	6	2,57*10 ³ 2,61*10 ³ 2,72*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,63 *10 ⁶	
Mischung 1_1	6	6,00*10 ¹ 6,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,67*10 ⁴	
Mischung 1_3	6	6,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,67 *10 ⁴	6,59*10 ⁴ ± 8,34*10 ³

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_4	6	5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33*10 ⁴	
Mischung 1_5	6	8,00*10 ¹ 8,00 *10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,67*10 ⁴	
Mischung 2_1	6	8,80*10 ² 8,10*10 ² 9,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,63*10 ⁵	
Mischung 2_2	6	2,90*10 ² 2,50*10 ² 1,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,37*10 ⁵	
Mischung 2_3	6	1,40*10 ² 1,50*10 ² 1,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,53*10 ⁵	1,94*10 ⁵ ± 3,80*10 ⁴
Mischung 2_4	6	2,10*10 ² 1,80*10 ² 2,50 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,13*10 ⁵	
Mischung 2_5	6	1,70*10 ² 2,10*10 ² 1,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,73*10 ⁵	

Tabelle 52: Belastungstest Hefen in VAE-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	1,25*10 ³ 9,80*10 ² 1,01*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,08*10 ⁶	
Farbe 1_2	0	1,17*10 ³ 1,24*10 ³ 1,13*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,18*10 ⁶	
Farbe 1_3	0	8,10*10 ² 1,05*10 ³ 9,30 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,30*10 ⁵	1,07*10 ⁶ ± 1,07*10 ⁵
Farbe 1_4	0	1,21*10 ³ 9,90*10 ² 9,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,05*10 ⁶	
Farbe 1_5	0	9,30*10 ² 1,27*10 ³ 1,16 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,12*10 ⁶	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_1	0	3,00*10 ² 4,50*10 ² 3,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,67*10 ⁵	
Farbe 2_2	0	3,70*10 ² 3,90*10 ² 4,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,03*10 ⁵	
Farbe 2_3	0	3,00*10 ² 3,20*10 ² 4,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,57*10 ⁵	3,83*10 ⁵ ± 4,19*10 ⁴
Farbe 2_4	0	4,30*10 ² 3,10*10 ² 2,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,43*10 ⁵	
Farbe 2_5	0	4,10*10 ² 4,20*10 ² 5,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,47*10 ⁵	
Farbe 3_1	0	6,90*10 ² 5,50*10 ² 4,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,77*10 ⁵	
Farbe 3_2	0	4,70*10 ² 4,10*10 ² 6,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,97*10 ⁵	
Farbe 3_3	0	1,70*10 ² 2,50*10 ² 2,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,13 *10 ⁵	4,75*10 ⁵ ± 2,13*10 ⁵
Farbe 3_4	0	3,30 *10 ² 3,40*10 ² 3,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,23*10 ⁵	
Farbe 3_5	0	6,30*10 ² 8,90 *10 ¹ 7,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,57*10 ⁵	
Farbe 4_1	0	2,70 *10 ² 3,20*10 ² 3,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00 *10 ⁵	
Farbe 4_2	0	3,50*10 ² 5,70*10 ² 5,30*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,83*10 ⁵	
Farbe 4_3	0	5,20*10 ² 5,70*10 ² 6,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,80 *10 ⁵	3,89*10 ⁵ ± 1,34*10 ⁵
Farbe 4_4	0	3,80 *10 ² 3,10*10 ² 2,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,97*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 4_5	0	2,20*10 ² 2,90 *10 ² 3,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,87*10 ⁵	
Mischung 1_1	0	6,40*10 ² 6,10*10 ² 7,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,60*10 ⁵	
Mischung 1_2	0	6,40*10 ² 9,00*10 ² 9,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,20 *10 ⁵	
Mischung 1_3	0	5,00 *10 ² 5,40*10 ² 5,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,43*10 ⁵	6,83*10 ⁵ ± 1,58*10 ⁵
Mischung 1_4	0	4,50*10 ² 5,30 *10 ² 5,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,20*10 ⁵	
Mischung 1_5	0	8,40*10 ² 9,90 *10 ² 7,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,70*10 ⁵	
Mischung 2_1	0	2,30*10 ² 3,10*10 ² 3,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,80*10 ⁵	
Mischung 2_2	0	2,90*10 ² 2,50*10 ² 3,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,83 *10 ⁵	
Mischung 2_3	0	3,70 *10 ² 5,20*10 ² 5,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,73*10 ⁵	3,43*10 ⁵ ± 1,38*10 ⁵
Mischung 2_4	0	6,00*10 ¹ 4,00 *10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,00*10 ⁴	
Mischung 2_5	0	2,10*10 ² 2,20 *10 ² 2,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,77*10 ⁵	
Farbe 1_1	1	2,07*10 ³ 1,82*10 ³ 1,73*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,87*10 ⁶	
Farbe 1_2	1	1,50*10 ³ 1,68*10 ³ 1,46*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,55*10 ⁶	
Farbe 1_3	1	1,31*10 ³ 1,65*10 ³ 1,82 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,59*10 ⁶	1,54*10 ⁶ ± 1,84*10 ⁵

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_4	1	1,44*10 ³ 1,81*10 ³ 1,94 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,73*10 ⁶	
Farbe 1_5	1	1,45*10 ³ 1,25*10 ³ 1,16 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,29*10 ⁶	
Farbe 1_1	2	1,56*10 ³ 2,08*10 ³ 2,08*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,91*10 ⁶	
Farbe 1_2	2	8,40*10 ² 9,40*10 ² 1,02*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,33*10 ⁵	
Farbe 1_3	2	1,07*10 ³ 1,08*10 ³ 1,32 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,16*10 ⁶	9,48*10 ⁵ ± 1,52*10 ⁵
Farbe 1_4	2	8,00*10 ² 7,40*10 ² 8,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,00*10 ⁵	
Farbe 1_5	2	8,50*10 ² 9,80*10 ² 8,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,00*10 ⁵	
Farbe 2_1	2	3,67*10 ³ 3,13*10 ³ 3,73*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,51*10 ⁶	
Farbe 2_2	2	8,30*10 ² 8,00*10 ² 9,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,67*10 ⁵	
Farbe 2_3	2	8,90*10 ² 7,60*10 ² 1,10*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,17*10 ⁵	8,72*10 ⁵ ± 3,45*10 ⁴
Farbe 2_4	2	7,80*10 ² 8,90*10 ² 8,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,33*10 ⁵	
Farbe 2_5	2	9,50*10 ² 7,90*10 ² 8,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,70*10 ⁵	
Mischung 1_1	2	1,00*10 ¹ 2,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁴	
Mischung 1_2	2	1,00*10 ¹ 2,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,67*10 ⁴	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_3	2	4,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁴	2,92*10 ⁴ ± 4,20*10 ³
Mischung 1_4	2	1,00*10 ¹ 4,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁴	
Mischung 1_5	2	3,00*10 ¹ 2,00*10 ¹ 2,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,33*10 ⁴	
Farbe 1_1	3	1,26*10 ³ 1,19*10 ³ 1,47*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,31*10 ⁶	
Farbe 1_2	3	3,60*10 ² 3,60*10 ² 6,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,43*10 ⁵	
Farbe 1_3	3	4,10*10 ² 2,80*10 ² 3,50 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,47*10 ⁵	4,18*10 ⁵ ± 5,59*10 ⁴
Farbe 1_4	3	3,40*10 ² 4,60*10 ² 4,10 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,03*10 ⁵	
Farbe 1_5	3	4,40*10 ² 5,30*10 ² 4,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,77*10 ⁵	
Farbe 2_1	3	3,38*10 ³ 3,21*10 ³ 4,33*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,64*10 ⁶	
Farbe 2_2	3	2,87*10 ³ 2,63*10 ³ 3,27*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,92 *10 ⁶	
Farbe 2_3	3	2,78*10 ³ 2,93*10 ³ 2,91*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,87*10 ⁶	3,22*10 ⁶ ± 4,11*10 ⁵
Farbe 2_4	3	3,63*10 ³ 3,87*10 ³ 3,57*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,69*10 ⁶	
Farbe 2_5	3	3,23*10 ³ 2,97*10 ³ 2,68*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,96*10 ⁶	
Mischung 1_1	3	6,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33*10 ⁴	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_2	3	9,00*10 ¹ 6,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,00*10 ⁴	
Mischung 1_3	3	7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,00*10 ⁴	6,67*10 ⁴ ± 1,36*10 ⁴
Mischung 1_4	3	5,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,67*10 ⁴	
Mischung 1_5	3	8,00*10 ¹ 1,00*10 ² 8,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,67*10 ⁴	
Farbe 1_1	4	9,50*10 ² 1,05*10 ³ 7,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,30*10 ⁵	
Farbe 1_2	4	1,40*10 ² 1,50*10 ² 1,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,50*10 ⁵	
Farbe 1_3	4	1,60*10 ² 2,40*10 ² 1,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,87*10 ⁵	1,69*10 ⁵ ± 1,53*10 ⁴
Farbe 1_4	4	1,80*10 ² 1,50*10 ² 1,90 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,73*10 ⁵	
Farbe 1_5	4	1,70*10 ² 1,50*10 ² 1,80 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,67*10 ⁵	
Farbe 2_1	4	1,53*10 ³ 1,56*10 ³ 1,31*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,47*10 ⁶	
Farbe 2_2	4	1,39*10 ³ 1,55*10 ³ 1,67*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,54 *10 ⁶	
Farbe 2_3	4	1,68*10 ³ 1,71*10 ³ 1,64*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,68*10 ⁶	1,71*10 ⁶ ± 2,34*10 ⁵
Farbe 2_4	4	1,86*10 ³ 1,95*10 ³ 2,28*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,03*10 ⁶	
Farbe 2_5	4	1,74*10 ³ 1,86*10 ³ 1,82*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,81*10 ⁶	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_1	4	1,50*10 ² 1,30*10 ² 8,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,20*10 ⁵	
Mischung 1_2	4	1,60*10 ² 1,70*10 ² 1,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,47*10 ⁵	
Mischung 1_3	4	1,00*10 ² 1,60*10 ² 1,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,33*10 ⁵	1,35*10 ⁵ ± 1,82*10 ⁴
Mischung 1_4	4	9,00*10 ¹ 2,10*10 ² 1,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,60*10 ⁵	
Mischung 1_5	4	8,00*10 ¹ 2,00*10 ² 9,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,23*10 ⁵	
Farbe 1_1	5	3,80*10 ² 3,60*10 ² 4,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,97 *10 ⁵	
Farbe 1_2	5	7,00*10 ¹ 9,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,67*10 ⁴	
Farbe 1_3	5	5,00*10 ¹ 6,00*10 ¹ 1,10 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33*10 ⁴	7,83*10 ⁴ ± 4,30*10 ³
Farbe 1_4	5	8,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 8,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,00*10 ⁴	
Farbe 1_5	5	6,00*10 ¹ 1,00*10 ² 9,00 *10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,33*10 ⁴	
Farbe 2_1	5	5,20*10 ² 5,70*10 ² 6,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,77 *10 ⁵	
Farbe 2_2	5	1,55*10 ³ 1,69*10 ³ 1,62*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,62 *10 ⁶	
Farbe 2_3	5	1,23*10 ³ 1,24*10 ³ 1,31*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,26*10 ⁶	1,40*10 ⁶ ± 1,56*10 ⁵
Farbe 2_4	5	1,21*10 ³ 1,45*10 ³ 1,38*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,35*10 ⁶	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_5	5	1,27*10 ³ 1,33*10 ³ 1,45*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,35*10 ⁶	
Mischung 1_1	5	8,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33*10 ⁴	
Mischung 1_2	5	7,00*10 ¹ 9,00*10 ¹ 1,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,67*10 ⁴	
Mischung 1_3	5	8,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,00*10 ⁴	7,08 *10 ⁴ ± 5,71*10 ³
Mischung 1_4	5	9,00*10 ¹ 7,00*10 ² 7,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,67*10 ⁴	
Mischung 1_5	5	7,00*10 ¹ 5,00*10 ² 7,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33*10 ⁴	
Farbe 1_1	6	1,40*10 ² 1,30*10 ² 1,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,50 *10 ⁵	
Farbe 1_2	6	3,00*10 ¹ 3,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,00*10 ⁴	
Farbe 1_3	6	2,00*10 ¹ 4,00*10 ¹ 4,00 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁴	3,83*10 ⁴ ± 4,30*10 ³
Farbe 1_4	6	6,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,33*10 ⁴	
Farbe 1_5	6	5,00*10 ¹ 3,00*10 ² 3,00 *10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,67*10 ⁴	
Farbe 2_1	6	1,28*10 ³ 1,39*10 ³ 1,11*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,26 *10 ⁶	
Farbe 2_2	6	9,40*10 ² 1,07*10 ³ 1,02*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,01 *10 ⁶	
Farbe 2_3	6	1,47*10 ³ 1,53*10 ³ 1,54*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,51*10 ⁶	1,28*10 ⁶ ± 2,08*10 ⁵

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 2_4	6	1,30*10 ³ 1,40*10 ³ 1,33*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,34*10 ⁶	
Farbe 2_5	6	6,10*10 ² 5,80*10 ² 6,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,17*10 ⁵	
Mischung 1_2	6	3,00*10 ¹ 3,00*10 ¹ 2,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,67*10 ⁴	
Mischung 1_3	6	3,00*10 ¹ 4,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,67*10 ⁴	2,33*10 ⁴ ± 2,03*10 ⁴
Mischung 1_4	6	5,00*10 ¹ 3,00*10 ² 2,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁴	
Mischung 1_5	6	4,00*10 ¹ 2,00*10 ² 3,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁴	

Tabelle 53: Belastungstest Bakterien in RA-haltiger Farbe

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	1,57*10 ³ 1,66*10 ² 1,67*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,63*10 ⁶	
Farbe 1_2	0	1,06*10 ⁴ 6,56*10 ³ 6,89*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,02*10 ⁶	
Farbe 1_3	0	1,02*10 ⁴ 9,28*10 ³ 6,56 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,69*10 ⁶	8,80*10 ⁶ ± 9,72*10 ⁵
Farbe 1_4	0	9,28*10 ³ 1,00*10 ⁴ 1,14 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,02*10 ⁷	
Farbe 1_5	0	7,44*10 ³ 9,85*10 ³ 7,44 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,24*10 ⁶	
Farbe 3_1	0	4,81*10 ³ 4,70*10 ³ 5,03 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,85*10 ⁶	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 3_2	0	1,78*10 ³ 1,63*10 ³ 1,97 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,79*10 ⁶	
Farbe 3_3	0	1,88*10 ³ 1,84*10 ³ 1,78 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,83*10 ⁶	2,00*10 ⁶ ± 2,60*10 ⁵
Farbe 3_4	0	2,45*10 ³ 1,79*10 ³ 2,85 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,36*10 ⁶	
Farbe 3_5	0	1,99*10 ³ 1,96*10 ³ 2,07 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,01*10 ⁶	
Mischung 1_1	0	2,17*10 ³ 2,29*10 ³ 2,29*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,25*10 ⁶	
Mischung 1_2	0	9,66*10 ³ 8,90*10 ³ 8,71*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,09*10 ⁶	
Mischung 1_3	0	8,52*10 ³ 8,90*10 ³ 8,71*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,71*10 ⁶	8,65*10 ⁶ ± 5,00*10 ⁵
Mischung 1_4	0	8,33*10 ³ 9,28*10 ³ 8,90*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,84*10 ⁶	
Mischung 1_5	0	8,52*10 ³ 9,28*10 ³ 6,02*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,94*10 ⁶	
Farbe 1_1	1	7,41*10 ⁴ 6,20*10 ⁴ 5,74*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,45*10 ⁷	
Farbe 1_2	1	5,65*10 ⁴ 4,72*10 ⁴ 5,56*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,31*10 ⁷	
Farbe 1_3	1	4,17*10 ⁴ 5,56*10 ⁴ 5,00 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,91*10 ⁷	5,58*10 ⁷ ± 6,79*10 ⁶
Farbe 1_4	1	6,67*10 ⁴ 6,11*10 ⁴ 5,65 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,14*10 ⁷	
Farbe 1_5	1	6,67*10 ⁴ 3,28*10 ⁴ 5,28 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,08*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	2	9,44*10 ⁴ 8,98*10 ⁴ 9,07*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,17*10 ⁷	
Farbe 1_2	2	1,17*10 ⁵ 1,17*10 ⁵ 9,07*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,08*10 ⁸	
Farbe 1_3	2	9,17*10 ⁴ 8,61*10 ⁴ 9,54 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,10*10 ⁷	1,01*10 ⁸ ± 1,12*10 ⁷
Farbe 1_4	2	9,91*10 ⁴ 9,91*10 ⁴ 9,44 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,75*10 ⁷	
Farbe 1_5	2	1,12*10 ⁵ 1,18*10 ⁵ 1,20 *10 ⁵	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,17*10 ⁸	
Farbe 1_1	3	9,85*10 ³ 1,17*10 ⁴ 1,04*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,07*10 ⁸	
Farbe 1_2	3	2,15*10 ⁴ 2,08*10 ⁴ 1,93*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,06*10 ⁸	
Farbe 1_3	3	1,29*10 ⁴ 1,14*10 ⁴ 1,38 *10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,27*10 ⁸	1,54*10 ⁸ ± 2,14*10 ⁷
Farbe 1_4	3	1,00*10 ⁴ 1,02*10 ⁴ 1,02 *10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,02*10 ⁸	
Farbe 1_5	3	1,29*10 ⁵ 1,14*10 ⁵ 1,38 *10 ⁵	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,27*10 ⁸	
Farbe 1_1	6	1,17*10 ⁴ 1,42*10 ⁴ 1,61*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,40*10 ⁸	
Farbe 1_2	6	1,64*10 ⁴ 1,64*10 ⁴ 1,00*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,43*10 ⁸	
Farbe 1_3	6	1,50*10 ⁴ 3,98*10 ⁴ 3,89 *10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	3,12*10 ⁸	1,37*10 ⁸ ± 1,70*10 ⁷
Farbe 1_4	6	1,12*10 ⁴ 1,16*10 ⁴ 5,18 *10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	9,30*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_5	6	1,75*10 ⁴	10 ⁴	1,79*10 ⁸	
		1,79*10 ⁴	10 ⁴		
		1,82*10 ⁴	10 ⁴		

Tabelle 54: Belastungstest Bakterien in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	7,77*10 ³	10 ³	8,59*10 ⁶	
		9,66*10 ³	10 ³		
		8,33*10 ³	10 ³		
Farbe 1_2	0	8,52*10 ³	10 ³	9,09*10 ⁶	
		9,09*10 ³	10 ³		
		9,66*10 ³	10 ³		
Farbe 1_3	0	7,77*10 ³	10 ³	8,14*10 ⁶	9,03*10 ⁶ ± 3,15*10 ⁵
		8,14*10 ³	10 ³		
		8,52 *10 ³	10 ³		
Farbe 1_4	0	2,25*10 ³	10 ³	2,53*10 ⁶	
		2,60*10 ³	10 ³		
		2,48*10 ³	10 ³		
Farbe 1_5	0	9,28*10 ³	10 ³	9,34*10 ⁶	
		1,04*10 ⁴	10 ³		
		8,52 *10 ³	10 ³		
Farbe 3_1	0	2,34*10 ³	10 ³	2,28*10 ⁶	
		2,28*10 ³	10 ³		
		2,22 *10 ³	10 ³		
Farbe 3_2	0	6,20*10 ³	10 ³	5,43*10 ⁶	
		4,50*10 ³	10 ³		
		5,60 *10 ³	10 ³		
Farbe 3_3	0	1,12*10 ³	10 ³	1,21*10 ⁶	1,70*10 ⁶ ± 4,47*10 ⁵
		1,19*10 ³	10 ³		
		1,37 *10 ³	10 ³		
Farbe 3_4	0	1,65*10 ³	10 ³	1,56*10 ⁶	
		1,50*10 ³	10 ³		
		1,53 *10 ³	10 ³		
Farbe 3_5	0	1,78*10 ³	10 ³	1,76*10 ⁶	
		1,63*10 ³	10 ³		
		1,86 *10 ³	10 ³		
Mischung 1_1	0	2,25*10 ³	10 ³	2,25*10 ⁶	
		2,17*10 ³	10 ³		
		2,34*10 ³	10 ³		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_2	0	3,00*10 ³ 2,94*10 ³ 2,77*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,90*10 ⁶	
Mischung 1_3	0	1,32*10 ³ 1,37*10 ³ 1,24*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,31*10 ⁶	2,41*10 ⁶ ± 6,78*10 ⁵
Mischung 1_4	0	3,40*10 ³ 2,68*10 ³ 2,63*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,90*10 ⁶	
Mischung 1_5	0	2,53*10 ³ 2,81*10 ³ 2,94*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,76*10 ⁶	
Farbe 1_1	1	3,89*10 ⁴ 3,89*10 ⁴ 3,80*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,86*10 ⁷	
Farbe 1_2	1	2,99*10 ⁴ 2,08*10 ⁴ 2,96*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,68*10 ⁷	
Farbe 1_3	1	4,07*10 ⁴ 2,66*10 ⁴ 3,98 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,57*10 ⁷	3,14*10 ⁷ ± 6,36*10 ⁶
Farbe 1_4	1	2,15*10 ⁴ 2,55*10 ⁴ 2,23 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,31*10 ⁷	
Farbe 1_5	1	4,17*10 ⁴ 3,98*10 ⁴ 1,64 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,26*10 ⁷	
Farbe 1_1	2	3,80*10 ⁴ 3,89*10 ⁴ 3,70*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,80*10 ⁷	
Farbe 1_2	2	3,28*10 ⁴ 3,14*10 ⁴ 3,03*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,15*10 ⁷	
Farbe 1_3	2	3,32*10 ⁴ 4,35*10 ⁴ 3,43 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,70*10 ⁷	3,48*10 ⁷ ± 2,76*10 ⁶
Farbe 1_4	2	2,81*10 ⁴ 3,07*10 ⁴ 4,54 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,47*10 ⁷	
Farbe 1_5	2	3,54*10 ⁴ 2,99*10 ⁴ 3,28 *10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,27*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	3	9,66*10 ³ 4,60*10 ³ 6,78*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	7,01*10 ⁷	
Farbe 1_2	3	8,14*10 ³ 8,33*10 ³ 6,67*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	7,72*10 ⁸	
Farbe 1_3	3	3,26*10 ³ 3,26*10 ³ 7,99 *10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,84*10 ⁷	5,93*10 ⁷ ± 5,04*10 ⁶
Farbe 1_4	3	8,52*10 ³ 8,90*10 ³ 8,52 *10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	8,65*10 ⁷	
Farbe 1_5	3	2,84*10 ⁵ 3,10*10 ⁵ 5,36 *10 ⁵	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,27*10 ⁸	
Farbe 1_1	6	4,70*10 ³ 5,58*10 ³ 5,58*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,29*10 ⁷	
Farbe 1_2	6	3,99*10 ³ 5,36*10 ³ 5,25*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,85*10 ⁷	
Farbe 1_3	6	2,57*10 ³ 2,26*10 ³ 2,53 *10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,45*10 ⁷	4,22*10 ⁷ ± 6,95*10 ⁶
Farbe 1_4	6	2,50*10 ³ 2,76*10 ³ 2,32 *10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,53*10 ⁷	
Farbe 1_5	6	8,33*10 ³ 8,14*10 ³ 9,47*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	8,65*10 ⁷	

Tabelle 55: Belastungstest Hefen in RA-haltiger Farbe

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	9,50*10 ² 9,90*10 ² 1,12*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,02*10 ⁶	
Farbe 1_2	0	8,70*10 ² 9,40*10 ² 8,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,80*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_3	0	8,60*10 ² 7,90*10 ² 9,50 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,67*10 ⁵	9,89*10 ⁵ ± 1,58*10 ⁵
Farbe 1_4	0	1,09*10 ³ 1,25*10 ³ 1,41*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,37*10 ⁶	
Farbe 1_5	0	8,90*10 ² 1,01*10 ³ 8,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,23*10 ⁵	
Farbe 3_1	0	5,90*10 ² 5,30*10 ² 4,80 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,33*10 ⁵	
Farbe 3_2	0	5,80*10 ² 4,60*10 ² 4,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,03*10 ⁵	
Farbe 3_3	0	1,20*10 ² 1,30*10 ² 1,80 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,43*10 ⁵	5,07*10 ⁵ ± 2,20*10 ⁴
Farbe 3_4	0	5,30*10 ² 4,90*10 ² 5,20 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,13*10 ⁵	
Farbe 3_5	0	5,20*10 ² 4,50*10 ² 4,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,80*10 ⁵	
Mischung 1_1	0	7,70*10 ² 7,40*10 ² 6,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33*10 ⁵	
Mischung 1_2	0	8,00*10 ² 6,80*10 ² 6,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,23*10 ⁵	
Mischung 1_3	0	6,30*10 ² 6,50*10 ² 5,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,23*10 ⁵	6,74*10 ⁵ ± 6,31*10 ⁴
Mischung 1_4	0	5,80*10 ² 6,60*10 ² 5,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,10*10 ⁵	Mischung 1_4
Mischung 1_5	0	1,90*10 ² 2,10*10 ² 2,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,17*10 ⁵	Mischung 1_5
Farbe 1_1	1	5,00*10 ² 5,30*10 ² 4,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,83*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_2	1	5,80*10 ² 6,90*10 ² 5,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,10*10 ⁵	
Farbe 1_3	1	4,30*10 ² 4,70*10 ² 3,90 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,30*10 ⁵	4,87*10 ⁵ ± 7,32*10 ⁴
Farbe 1_4	1	4,20*10 ² 3,70*10 ² 5,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33*10 ⁵	
Farbe 1_5	1	5,20*10 ² 4,80*10 ² 4,30 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,77*10 ⁵	
Farbe 1_1	2	3,50*10 ² 2,90*10 ² 3,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,20*10 ⁵	
Farbe 1_2	2	3,50*10 ² 3,00*10 ² 3,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,23*10 ⁵	
Farbe 1_3	2	3,60*10 ² 3,10*10 ² 2,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,13*10 ⁵	3,11*10 ⁵ ± 2,33*10 ⁴
Farbe 1_4	2	3,10*10 ² 3,30*10 ² 3,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,27*10 ⁵	
Farbe 1_5	2	2,40*10 ² 2,60*10 ² 3,10 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,70*10 ⁵	
Mischung 1_1	2	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Mischung 1_2	2	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Mischung 1_3	2	5,10*10 ² 6,00*10 ² 4,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,23*10 ⁵	1,81*10 ⁵ ± 2,52*10 ⁵
Mischung 1_4	2	4,10*10 ² 3,40*10 ² 3,90 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,80*10 ⁵	
Mischung 1_5	2	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	Mischung 1_5

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	3	3,10*10 ² 2,90*10 ² 3,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,10*10 ⁵	
Farbe 1_2	3	2,80*10 ² 3,60*10 ² 3,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,30*10 ⁵	
Farbe 1_3	3	3,20*10 ² 3,40*10 ² 2,90 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,17*10 ⁵	2,98*10 ⁵ ± 3,40*10 ⁴
Farbe 1_4	3	2,70*10 ² 2,60*10 ² 3,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,90*10 ⁵	
Farbe 1_5	3	2,40*10 ² 2,70*10 ² 2,20 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,43*10 ⁵	
Mischung 1_1	3	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Mischung 1_2	3	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Mischung 1_3	3	1,50*10 ² 1,30*10 ² 1,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,33*10 ⁵	4,76*10 ⁴ ± 6,59*10 ⁴
Mischung 1_4	3	9,00*10 ¹ 1,30*10 ² 9,00 *10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,03*10 ⁵	
Mischung 1_5	3	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Farbe 1_1	6	3,10*10 ² 2,90*10 ² 3,00*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	3,00*10 ⁴	
Farbe 1_2	6	2,90*10 ² 3,70*10 ² 3,60*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	3,40*10 ⁴	
Farbe 1_3	6	3,60*10 ² 3,70*10 ² 4,70 *10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	4,00*10 ⁴	3,47*10 ⁴ ± 3,91*10 ³
Farbe 1_4	6	3,00*10 ² 4,70*10 ² 3,40*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	3,70*10 ⁴	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_5	6	2,70*10 ² 3,80*10 ² 3,10 *10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	3,20*10 ⁴	
Mischung 1_1	6	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Mischung 1_2	6	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	
Mischung 1_3	6	2,10*10 ² 1,90*10 ² 2,90*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	2,30*10 ⁴	1,07*10 ⁴ ± 1,48*10 ⁴
Mischung 1_4	6	3,00*10 ² 3,10*10 ² 3,00 *10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	3,03*10 ⁴	
Mischung 1_5	6	0,00 0,00 0,00	10 ³ 10 ³ 10 ³	0,00	

Tabelle 56: Belastungstest Hefen in RA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	0	1,10*10 ³ 8,70*10 ² 9,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,70 *10 ⁵	
Farbe 1_2	0	9,00*10 ² 8,000*10 ² 8,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,43*10 ⁵	
Farbe 1_3	0	1,30*10 ² 1,60*10 ² 1,90 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,60*10 ⁵	9,72*10 ⁵ ± 1,14*10 ⁵
Farbe 1_4	0	9,80*10 ² 1,01*10 ³ 8,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,53*10 ⁵	
Farbe 1_5	0	1,11*10 ³ 1,23*10 ³ 1,23 *10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,12*10 ⁶	
Farbe 3_1	0	6,50*10 ² 5,70*10 ² 4,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,40 *10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 3_2	0	4,50*10 ² 3,90*10 ² 4,80*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,40*10 ⁵	
Farbe 3_3	0	4,20*10 ² 3,90*10 ² 4,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,23*10 ⁵	4,74*10 ⁵ ± 4,70*10 ⁴
Farbe 3_4	0	4,40*10 ² 4,40*10 ² 6,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,00*10 ⁵	
Farbe 3_5	0	4,60*10 ² 4,20*10 ² 5,20 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,67*10 ⁵	
Mischung 1_1	0	6,70*10 ² 6,40*10 ² 5,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33*10 ⁵	
Mischung 1_2	0	8,30*10 ² 6,80*10 ² 7,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,37*10 ⁵	
Mischung 1_3	0	7,30*10 ² 7,50*10 ² 6,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,23*10 ⁵	7,00*10 ⁵ ± 4,63*10 ⁴
Mischung 1_4	0	6,80*10 ² 7,00*10 ² 7,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,07*10 ⁵	
Mischung 1_5	0	2,90*10 ² 3,10*10 ² 3,50*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,17*10 ⁵	
Farbe 1_1	1	1,80*10 ² 1,60*10 ² 1,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,50*10 ⁵	
Farbe 1_2	1	2,00*10 ² 1,60*10 ² 1,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,63*10 ⁵	
Farbe 1_3	1	1,30*10 ² 1,70*10 ² 1,50 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,50*10 ⁵	1,57*10 ⁵ ± 6,50*10 ³
Farbe 1_4	1	2,10*10 ² 1,60*10 ² 1,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,60*10 ⁵	
Farbe 1_5	1	1,10*10 ² 2,00*10 ² 1,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,57*10 ⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_1	2	2,10*10 ² 1,70*10 ² 2,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,07*10 ⁵	
Farbe 1_2	2	9,00*10 ¹ 1,20*10 ² 1,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,13*10 ⁵	
Farbe 1_3	2	1,80*10 ² 2,10*10 ² 2,20 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,03*10 ⁵	1,99*10 ⁵ ± 5,94*10 ⁴
Farbe 1_4	2	2,00*10 ² 2,80*10 ² 3,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,80*10 ⁵	
Farbe 1_5	2	1,80*10 ² 1,80*10 ² 2,10 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,90*10 ⁵	
Farbe 1_1	3	1,30*10 ² 1,70*10 ² 2,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,73*10 ⁵	
Farbe 1_2	3	1,40*10 ² 2,10*10 ² 1,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,50*10 ⁵	
Farbe 1_3	3	1,90*10 ² 2,00*10 ² 2,70 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,20*10 ⁵	2,28*10 ⁵ ± 8,17*10 ⁴
Farbe 1_4	3	3,40*10 ² 3,50*10 ² 3,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,60*10 ⁵	
Farbe 1_5	3	3,10*10 ² 2,40*10 ² 1,60 *10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,37*10 ⁵	
Farbe 1_1	6	2,40*10 ² 1,90*10 ² 3,40*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	2,57*10 ⁴	
Farbe 1_2	6	2,10*10 ² 1,70*10 ² 3,10*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	2,30*10 ⁴	
Farbe 1_3	6	1,90*10 ² 2,40*10 ² 2,70 *10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	2,33*10 ⁴	2,22*10 ⁴ ± 2,96*10 ³
Farbe 1_4	6	1,90*10 ² 1,30*10 ² 2,10*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	1,77*10 ⁴	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe 1_5	6	1,90*10 ²	10 ²	2,13*10 ⁴	
		2,60*10 ²	10 ²		
		1,90 *10 ²	10 ²		

Tabelle 57: Belastungstest Bakterien in SA-haltiger Farbe

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe A_1	0	5,49*10 ³	10 ³	8,64 *10 ⁶	
		1,13*10 ⁴	10 ³		
		9,12*10 ³	10 ³		
Farbe A_2	0	8,76*10 ³	10 ³	9,25*10 ⁶	
		9,12*10 ³	10 ³		
		9,85*10 ³	10 ³		
Farbe A_3	0	6,44*10 ³	10 ³	8,23*10 ⁶	8,58*10 ⁶ ± 4,70*10 ⁵
		8,76*10 ³	10 ³		
		9,49*10 ³	10 ³		
Farbe A_4	0	3,98*10 ³	10 ³	8,75*10 ⁶	
		1,06*10 ⁴	10 ³		
		1,17*10 ⁴	10 ³		
Farbe A_5	0	6,63*10 ³	10 ³	8,05*10 ⁶	
		9,85*10 ³	10 ³		
		7,66*10 ³	10 ³		
Farbe B_1	0	1,94*10 ⁴	10 ³	1,26 *10 ⁷	
		8,03*10 ³	10 ³		
		1,02*10 ⁴	10 ³		
Farbe B_2	0	1,52*10 ³	10 ³	1,58*10 ⁶	
		1,63*10 ³	10 ³		
		1,62*10 ³	10 ³		
Farbe B_3	0	8,76*10 ³	10 ³	9,12*10 ⁶	1,03*10 ⁷ ± 1,99*10 ⁶
		8,76*10 ³	10 ³		
		9,85*10 ³	10 ³		
Farbe B_4	0	9,49*10 ³	10 ³	1,27*10 ⁷	
		1,24*10 ⁴	10 ³		
		1,17*10 ⁴	10 ³		
Farbe B_5	0	4,92*10 ³	10 ³	8,21*10 ⁶	Farbe B_5
		1,17*10 ⁴	10 ³		
		8,03*10 ³	10 ³		
Farbe C_1	0	9,49*10 ³	10 ³	1,09 *10 ⁷	Farbe C_1
		1,13*10 ⁴	10 ³		
		1,20*10 ⁴	10 ³		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe C_2	0	1,02*10 ⁴ 1,06*10 ⁴ 1,17*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,08*10 ⁷	
Farbe C_3	0	8,39*10 ³ 1,06*10 ⁴ 9,12*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,37*10 ⁶	9,74*10 ⁶ ± 1,06*10 ⁶
Farbe C_4	0	8,03*10 ³ 8,39*10 ³ 9,12*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,52*10 ⁶	
Farbe C_5	0	8,76*10 ³ 8,76*10 ³ 9,85*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,12*10 ⁶	
Farbe D_1	0	4,17*10 ³ 5,30*10 ³ 6,06*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,18 *10 ⁶	
Farbe D_2	0	4,17*10 ³ 4,55*10 ³ 5,30*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,67*10 ⁶	
Farbe D_3	0	4,36*10 ³ 4,55*10 ³ 5,11*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,67*10 ⁶	4,28*10 ⁶ ± 8,22*10 ⁵
Farbe D_4	0	3,25*10 ³ 2,83*10 ³ 2,91*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,00*10 ⁶	
Farbe D_5	0	4,17*10 ³ 3,98*10 ³ 3,79*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,98*10 ⁶	
Farbe B_1	3	7,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,00 *10 ⁴	
Farbe B_2	3	8,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33 *10 ⁴	
Farbe B_3	3	6,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,67 *10 ⁴	6,93*10 ⁴ ± 4,34*10 ³
Farbe B_4	3	8,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33 *10 ⁴	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe B_5	3	8,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33 *10 ⁴	Farbe B_5
Farbe C_1	3	5,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,33 *10 ⁴	
Farbe C_2	3	8,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 8,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,00 *10 ⁴	
Farbe C_4	3	7,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,00 *10 ⁴	5,20*10 ⁴ ± 2,93*10 ⁴
Farbe C_5	3	8,00*10 ¹ 8,00*10 ¹ 6,00*10 ¹	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,33 *10 ⁴	
Farbe B_1	6	1,17*10 ⁴ 1,09*10 ⁴ 8,39*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,03 *10 ⁷	
Farbe B_2	6	2,87*10 ³ 3,04*10 ³ 2,91*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,94 *10 ⁶	
Farbe B_3	6	3,45*10 ³ 3,50*10 ³ 3,58*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,51 *10 ⁶	Farbe B_3
Farbe B_4	6	2,97*10 ³ 3,14*10 ³ 2,95*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,02 *10 ⁶	Farbe B_4
Farbe B_5	6	3,51*10 ³ 3,48*10 ³ 3,69*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,56 *10 ⁶	Farbe B_5
Farbe C_1	6	2,73*10 ³ 2,99*10 ³ 3,01*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,91 *10 ⁶	
Farbe C_2	6	2,54*10 ³ 2,83*10 ³ 2,64*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,67 *10 ⁶	
Farbe C_4	6	2,32*10 ³ 2,51*10 ³ 2,40*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,41 *10 ⁶	2,14*10 ⁶ ± 1,21*10 ⁶
Farbe C_5	6	2,61*10 ³ 2,82*10 ³ 2,72*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,72 *10 ⁶	

Tabelle 58: Belastungstest Bakterien in SA-haltiger Farbe nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe A_1	0	8,03*10 ³ 1,06*10 ⁴ 8,39*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,00 *10 ⁶	
Farbe A_2	0	1,06*10 ⁴ 8,76*10 ³ 8,03*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,12*10 ⁶	
Farbe A_3	0	9,49*10 ³ 1,09*10 ⁴ 1,17*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,07*10 ⁷	9,61*10 ⁶ ± 6,72*10 ⁵
Farbe A_4	0	7,01*10 ³ 7,77*10 ³ 1,42*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,67*10 ⁶	
Farbe A_5	0	6,06*10 ³ 1,06*10 ⁴ 1,20*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,56*10 ⁶	
Farbe B_1	0	1,35*10 ⁴ 1,13*10 ⁴ 1,02*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,17 *10 ⁷	
Farbe B_2	0	1,20*10 ⁴ 1,50*10 ⁴ 8,39*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,18*10 ⁷	
Farbe B_3	0	1,06*10 ⁴ 1,09*10 ⁴ 9,12*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,02*10 ⁷	1,05*10 ⁷ ± 1,14*10 ⁶
Farbe B_4	0	9,85*10 ³ 1,02*10 ⁴ 8,03*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,37*10 ⁶	
Farbe B_5	0	9,66*10 ³ 8,52*10 ³ 1,08*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,66*10 ⁶	
Farbe C_1	0	7,66*10 ³ 1,09*10 ⁴ 4,55*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,72 *10 ⁶	
Farbe C_2	0	8,03*10 ³ 8,76*10 ³ 7,66*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,15*10 ⁶	
Farbe C_3	0	8,39*10 ³ 7,66*10 ³ 5,68*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,25*10 ⁶	7,86*10 ⁶ ± 4,37*10 ⁵

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe C_4	0	7,66 *10 ³ 8,39*10 ³ 9,12*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,39*10 ⁶	
Farbe C_5	0	9,12*10 ³ 4,36*10 ³ 9,85*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,78*10 ⁶	
Farbe D_1	0	4,92*10 ³ 5,49*10 ³ 4,55*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,99 *10 ⁶	
Farbe D_2	0	5,87*10 ³ 5,11*10 ³ 5,87*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,62*10 ⁶	
Farbe D_3	0	4,36*10 ³ 4,73*10 ³ 5,30*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,80*10 ⁶	5,24*10 ⁶ ± 4,08*10 ⁵
Farbe D_4	0	8,76*10 ³ 8,39*10 ³	10 ³ 10 ³	5,72 *10 ⁶	
Farbe D_5	0	3,98*10 ³ 5,30*10 ³ 5,87*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,05*10 ⁶	
Farbe A_1	1	4,07*10 ⁴ 4,44*10 ⁴ 5,09*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,54 *10 ⁸	
Farbe A_2	1	4,07*10 ⁴ 4,63*10 ⁴ 4,17*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,29*10 ⁸	
Farbe A_3	1	4,72*10 ⁴ 4,44*10 ⁴ 4,35*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,51*10 ⁸	4,32*10 ⁸ ± 2,06*10 ⁷
Farbe A_4	1	3,80*10 ⁴ 4,17*10 ⁴ 4,54*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,17*10 ⁸	
Farbe A_5	1	4,72*10 ⁴ 3,24*10 ⁴ 4,26*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,07*10 ⁸	
Farbe B_1	1	2,13*10 ⁴ 2,59*10 ⁴ 2,04*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,25 *10 ⁷	
Farbe B_2	1	2,08*10 ⁴ 1,50*10 ⁴ 1,75*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,78*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe B_3	1	1,79*10 ⁴ 1,72*10 ⁴ 2,26*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,92*10 ⁷	2,11*10 ⁷ ± 3,91*10 ⁶
Farbe B_4	1	2,26*10 ⁴ 1,61*10 ⁴ 1,72*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,86*10 ⁷	
Farbe B_5	1	2,66*10 ⁴ 2,52*10 ⁴ 2,99*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,73*10 ⁷	
Farbe C_1	1	3,90*10 ² 4,10*10 ² 3,00*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,67 *10 ⁵	
Farbe C_2	1	2,92*10 ³ 3,28*10 ³ 2,55*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,92*10 ⁶	
Farbe C_3	1	3,98*10 ³ 2,72*10 ³ 2,77*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,16*10 ⁶	3,52*10 ⁶ ± 5,92*10 ⁵
Farbe C_4	1	3,98 *10 ³ 4,55*10 ³ 4,17*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,23*10 ⁶	
Farbe C_5	1	3,72*10 ³ 3,39*10 ³ 4,17*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,76*10 ⁶	
Farbe A_1	2	2,50*10 ⁴ 2,22*10 ⁴ 2,31*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,35 *10 ⁸	
Farbe A_2	2	3,98*10 ⁴ 4,35*10 ⁴ 3,70*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	4,01*10 ⁸	
Farbe A_3	2	2,59*10 ⁴ 3,06*10 ⁴ 2,13*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,59*10 ⁸	2,83*10 ⁸ ± 7,38*10 ⁷
Farbe A_4	2	3,43*10 ⁴ 2,31*10 ⁴ 2,96*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,90*10 ⁸	
Farbe A_5	2	2,13*10 ⁴ 2,31*10 ⁴ 1,94*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	2,13*10 ⁸	
Farbe B_1	2	1,00*10 ⁴ 9,66*10 ³ 1,03*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,00 *10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe B_2	2	1,42*10 ⁴ 7,95*10 ³ 5,11*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,10*10 ⁶	
Farbe B_3	2	1,06*10 ⁴ 9,85*10 ³ 7,66*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,37*10 ⁶	9,75*10 ⁶ ± 1,46*10 ⁶
Farbe B_4	2	7,95*10 ³ 7,95*10 ³ 8,71*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	8,21*10 ⁶	
Farbe B_5	2	1,16*10 ⁴ 1,23*10 ⁴ 1,23*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,21*10 ⁷	
Farbe C_1	2	1,36*10 ⁴ 1,50*10 ⁴ 1,38*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,41*10 ⁷	
Farbe C_2	2	1,61*10 ⁴ 1,65*10 ⁴ 1,88*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,58*10 ⁷	
Farbe C_3	2	2,50*10 ⁴ 2,96*10 ⁴ 2,31*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,59 *10 ⁷	1,82*10 ⁷ ± 5,27*10 ⁶
Farbe C_4	2	1,70*10 ⁴ 1,53*10 ⁴ 1,88*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,70 *10 ⁷	
Farbe C_5	2	8,76*10 ³ 8,39*10 ³ 6,82*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,99 *10 ⁶	
Farbe A_1	3	1,13*10 ⁴ 9,49*10 ³ 1,06*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,05 *10 ⁸	
Farbe A_2	3	1,13*10 ⁴ 1,02*10 ⁴ 1,20*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,10*10 ⁸	
Farbe A_3	3	1,35*10 ⁴ 2,31*10 ⁴ 1,28*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,65*10 ⁸	1,20*10 ⁸ ± 1,63*10 ⁷
Farbe A_4	3	5,11*10 ³ 6,06*10 ³ 5,30*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	5,49*10 ⁷	
Farbe A_5	3	1,28*10 ⁴ 1,06*10 ⁴ 8,76*10 ³	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,07*10 ⁸	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe B_1	3	4,94*10 ³ 5,38*10 ³ 6,63*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,65 *10 ⁶	
Farbe B_2	3	6,18*10 ³ 4,75*10 ³ 2,58*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,22*10 ⁶	
Farbe B_3	3	5,58*10 ³ 5,74*10 ³ 5,23*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,52*10 ⁶	4,62*10 ⁶ ± 1,13*10 ⁶
Farbe B_4	3	3,85*10 ³ 4,14*10 ³ 3,30*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,76*10 ⁶	
Farbe B_5	3	3,48*10 ³ 3,60*10 ³ 3,50*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,53*10 ⁶	
Farbe C_1	3	3,30*10 ³ 2,58*10 ³ 2,65*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,84*10 ⁶	
Farbe C_2	3	4,28*10 ³ 3,92*10 ³ 3,92*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,04*10 ⁶	
Farbe C_3	3	3,44*10 ³ 4,00*10 ³ 4,07*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,84*10 ⁶	4,30*10 ⁶ ± 1,13*10 ⁶
Farbe C_4	3	5,26*10 ³ 5,03*10 ³ 4,70*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,00*10 ⁶	
Farbe C_5	3	5,70*10 ² 5,50*10 ² 6,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,80*10 ⁵	
Farbe A_1	6	9,85*10 ³ 8,39*10 ³ 1,28*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,03 *10 ⁸	
Farbe A_2	6	1,13*10 ⁴ 1,35*10 ⁴ 1,20*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,23*10 ⁸	
Farbe A_3	6	9,12*10 ³ 2,13*10 ⁴ 1,17*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,40*10 ⁸	1,08*10 ⁸ ± 1,11*10 ⁷
Farbe A_4	6	1,94*10 ⁴ 2,04*10 ⁴ 1,94*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,98*10 ⁸	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Farbe A_5	6	1,64*10 ⁴ 1,35*10 ⁴ 1,24*10 ⁴	10 ⁴ 10 ⁴ 10 ⁴	1,41*10 ⁸	
Farbe B_1	6	4,73*10 ³ 5,30*10 ³ 4,36*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,80 *10 ⁶	
Farbe B_2	6	2,41*10 ³ 2,63*10 ³ 2,30*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,44*10 ⁶	
Farbe B_3	6	3,39*10 ³ 5,11*10 ³ 4,92*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,48*10 ⁶	4,29*10 ⁶ ± 1,11*10 ⁶
Farbe B_4	6	4,17*10 ³ 4,36*10 ³ 4,55*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,36*10 ⁶	
Farbe B_5	6	4,55*10 ³ 5,49*10 ³ 6,06*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,37*10 ⁶	
Farbe C_1	6	2,74*10 ³ 2,60*10 ³ 2,44*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,59*10 ⁶	
Farbe C_2	6	2,04*10 ³ 2,22*10 ³ 2,40*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,22*10 ⁶	
Farbe C_3	6	2,59*10 ³ 2,75*10 ³ 2,69*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,68*10 ⁶	2,49*10 ⁶ ± 2,11*10 ⁵
Farbe C_4	6	2,87*10 ³ 2,94*10 ³ 2,10*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,64*10 ⁶	
Farbe C_5	6	2,50*10 ² 2,10*10 ² 2,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,30*10 ⁵	Farbe C_5

Rot markierte Zahlen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

8.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheit in Bodenbelagsklebstoffen

Tabelle 59: Belastungstest Bakterien in Bodenbelagsklebstoffen

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_1	0	9,85*10 ³ 1,04*10 ⁴ 1,02*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,02*10 ⁷	
Klebstoff A_2	0	6,25*10 ³ 5,30*10 ³ 4,17*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,24*10 ⁶	
Klebstoff A_3	0	1,42*10 ⁴ 1,17*10 ⁴ 1,27*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,29*10 ⁷	1,15*10 ⁷ ± 1,28*10 ⁶
Klebstoff A_4	0	1,27*10 ⁴ 1,02*10 ⁴ 9,29*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,07*10 ⁷	
Klebstoff A_5	0	1,24*10 ⁴ 1,31*10 ⁴ 1,13*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,23*10 ⁷	
Klebstoff B_1	0	2,22*10 ⁴ 1,39*10 ⁴ 1,24*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,62*10 ⁷	
Klebstoff B_2	0	6,25*10 ³ 7,77*10 ³ 8,39*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,47*10 ⁶	
Klebstoff B_3	0	1,35*10 ⁴ 1,06*10 ⁴ 2,31*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,57*10 ⁷	1,54*10 ⁷ ± 7,26*10 ⁵
Klebstoff B_4	0	1,53*10 ⁴ 2,31*10 ⁴ 4,92*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,45*10 ⁷	
Klebstoff B_5	0	1,53*10 ⁴ 1,68*10 ⁴ 1,35*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,52*10 ⁷	
Mischung 1_1	0	9,12*10 ³ 1,06*10 ⁴ 1,02*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	9,98*10 ⁶	
Mischung 1_2	0	7,01*10 ³ 7,58*10 ³ 8,14*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,58*10 ⁶	
Mischung 1_3	0	1,17*10 ⁴	10 ³	1,17*10 ⁷	1,09*10 ⁷ ± 7,16*10 ⁵

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_4	0	1,35*10 ⁴ 1,20*10 ⁴ 7,77*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,11*10 ⁷	
Mischung 1_5	0	1,72*10 ⁴ 7,95*10 ³ 7,20*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,08*10 ⁷	
Klebstoff A_1	1	1,20*10 ⁴ 1,24*10 ⁴ 1,17*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,20*10 ⁷	
Klebstoff A_2	1	1,17*10 ⁴ 1,35*10 ⁴ 8,39*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,12*10 ⁷	
Klebstoff A_3	1	1,39*10 ⁴ 1,46*10 ⁴ 2,50*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,78*10 ⁷	1,50*10 ⁷ ± 3,90*10 ⁶
Klebstoff A_4	1	3,39*10 ³ 3,17*10 ³ 2,95*10 ³	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,17*10 ⁶	
Klebstoff A_5	1	1,85*10 ⁴ 1,94*10 ⁴ 1,85*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	1,88*10 ⁷	
Klebstoff A_1	2	3,06*10 ⁴ 3,15*10 ⁴ 2,96*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,06*10 ⁷	
Klebstoff A_2	2	3,33*10 ⁴ 3,15*10 ⁴ 3,52*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,33*10 ⁷	
Klebstoff A_3	2	2,96*10 ⁴ 3,33*10 ⁴ 3,33*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,21*10 ⁷	3,05*10 ⁷ ± 3,71*10 ⁶
Klebstoff A_4	2	2,41*10 ⁴ 2,22*10 ⁴ 2,59*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	2,41*10 ⁷	
Klebstoff A_5	2	2,50*10 ⁴ 3,98*10 ⁴ 3,24*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	3,24*10 ⁷	
Klebstoff A_1	3	5,19*10 ⁴ 6,76*10 ⁴ 6,39*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,11*10 ⁷	
Klebstoff A_2	3	8,70*10 ⁴ 7,04*10 ⁴ 6,94*10 ⁴	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,56*10 ⁷	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_3	3	5,83*10 ⁴	10 ³	6,23*10 ⁷	6,37*10 ⁷ ± 7,46*10 ⁶
		6,30*10 ⁴	10 ³		
		6,57*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_4	3	6,11*10 ⁴	10 ³	5,52*10 ⁷	
		5,00*10 ⁴	10 ³		
		5,46*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_5	3	7,04*10 ⁴	10 ³	6,42*10 ⁷	
		5,46*10 ⁴	10 ³		
		6,76*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_1	6	5,11*10 ³	10 ⁴	4,22*10 ⁷	
		4,36*10 ³	10 ⁴		
		3,19*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_2	6	7,58*10 ³	10 ⁴	5,47*10 ⁷	
		8,52*10 ³	10 ⁴		
		3,10*10 ²	10 ⁴		
Klebstoff A_3	6	4,55*10 ³	10 ⁴	4,86*10 ⁷	4,36*10 ⁷ ± 7,15*10 ⁶
		4,73*10 ³	10 ⁴		
		5,30*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_4	6	3,79*10 ³	10 ⁴	5,52*10 ⁷	
		3,17*10 ³	10 ⁴		
		3,50*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_5	6	7,66*10 ³	10 ⁴	5,59*10 ⁷	
		4,36*10 ³	10 ⁴		
		4,73*10 ³	10 ⁴		

Tabelle 60: Belastungstest Bakterien in Bodenbelagsklebstoffen nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_1	0	5,87*10 ³	10 ³	5,68*10 ⁶	
		5,68*10 ³	10 ³		
		5,49*10 ³	10 ³		
Klebstoff A_2	0	2,90*10 ³	10 ³	2,81*10 ⁶	
		2,87*10 ³	10 ³		
		2,66*10 ³	10 ³		
Klebstoff A_3	0	3,57*10 ³	10 ³	3,52*10 ⁶	4,31*10 ⁶ ± 1,51*10 ⁶
		3,52*10 ³	10 ³		
		3,48*10 ³	10 ³		
Klebstoff A_4	0	3,28*10 ³	10 ³	3,34*10 ⁶	
		3,40*10 ³	10 ³		
		3,34*10 ³	10 ³		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_5	0	5,68*10 ³	10 ³	6,00*10 ⁶	
		5,30*10 ⁶	10 ³		
		7,01*10 ³	10 ³		
Klebstoff B_1	0	2,44*10 ³	10 ³	2,64*10 ⁶	
		2,88*10 ³	10 ³		
		2,59*10 ³	10 ³		
Klebstoff B_2	0	1,30*10 ³	10 ³	1,27*10 ⁶	
		1,23*10 ³	10 ³		
		1,27*10 ³	10 ³		
Klebstoff B_3	0	1,23*10 ³	10 ³	1,12*10 ⁶	2,43*10 ⁶ ± 1,81*10 ⁶
		1,15*10 ³	10 ³		
		9,90*10 ²	10 ³		
Klebstoff B_4	0	6,25*10 ³	10 ³	5,49*10 ⁶	
		3,98*10 ³	10 ³		
		6,25*10 ³	10 ³		
Klebstoff B_5	0	1,59*10 ³	10 ³	1,64*10 ⁶	
		1,86*10 ³	10 ³		
		1,47*10 ³	10 ³		
Mischung 1_1	0	1,49*10 ³	10 ³	1,52*10 ⁶	
		1,50*10 ³	10 ³		
		1,58*10 ³	10 ³		
Mischung 1_2	0	1,75*10 ³	10 ³	1,70*10 ⁶	
		1,62*10 ³	10 ³		
		1,72*10 ³	10 ³		
Mischung 1_3	0	1,72*10 ³	10 ³	1,76*10 ⁶	1,31*10 ⁶ ± 5,06*10 ⁵
		1,72*10 ³	10 ³		
		1,85*10 ³	10 ³		
Mischung 1_4	0	1,065*10 ³	10 ³	1,05*10 ⁶	
		9,40*10 ²	10 ³		
		1,14*10 ³	10 ³		
Mischung 1_5	0	5,30*10 ²	10 ³	5,40*10 ⁵	
		5,70*10 ²	10 ³		
		5,20*10 ²	10 ³		
Klebstoff A_1	1	3,33*10 ⁴	10 ³	4,20*10 ⁷	
		4,44*10 ⁴	10 ³		
		4,81*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_2	1	3,33*10 ⁴	10 ³	3,52*10 ⁷	
		3,33*10 ⁴	10 ³		
		3,89*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_3	1	4,07*10 ⁴	10 ³	4,29*10 ⁷	4,03*10 ⁷ ± 4,94*10 ⁶
		4,63*10 ⁴	10 ³		
		4,17*10 ⁴	10 ³		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_4	1	5,19*10 ⁴	10 ³	4,63*10 ⁷	
		3,61*10 ⁴	10 ³		
		5,09*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_5	1	3,33*10 ⁴	10 ³	3,52*10 ⁷	
		2,59*10 ⁴	10 ³		
		4,63*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_1	2	2,09*10 ³	10 ⁴	2,0833*10 ⁷	
		2,10*10 ³	10 ⁴		
		2,04*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_2	2	2,12*10 ³	10 ⁴	2,12*10 ⁷	
		2,17*10 ³	10 ⁴		
		2,08*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_3	2	3,90*10 ³	10 ⁴	3,17*10 ⁷	2,75*10 ⁷ ± 6,98*10 ⁶
		2,60*10 ³	10 ⁴		
		3,00*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_4	2	2,74*10 ³	10 ⁴	2,70*10 ⁷	
		2,74*10 ³	10 ⁴		
		2,63*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_5	2	2,98*10 ³	10 ⁴	3,15*10 ⁷	
		3,25*10 ³	10 ⁴		
		3,21*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_1	3	5,28*10 ⁴	10 ³	5,00*10 ⁷	
		4,81*10 ⁴	10 ³		
		4,91*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_2	3	4,26*10 ⁴	10 ³	4,20*10 ⁷	
		3,98*10 ⁴	10 ³		
		4,35*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_3	3	6,67*10 ⁴	10 ³	6,45*10 ⁷	4,83*10 ⁷ ± 9,69*10 ⁶
		6,48*10 ⁴	10 ³		
		6,20*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_4	3	4,17*10 ⁴	10 ³	4,35*10 ⁷	
		4,07*10 ⁴	10 ³		
		4,81*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_5	3	3,89*10 ⁴	10 ³	4,14*10 ⁷	
		3,89*10 ⁴	10 ³		
		4,63*10 ⁴	10 ³		
Klebstoff A_1	6	9,47*10 ³	10 ⁴	7,64*10 ⁷	
		8,14*10 ³	10 ⁴		
		5,30*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_2	6	1,12*10 ⁴	10 ⁴	1,12*10 ⁸	
		1,17*10 ⁴	10 ⁴		
		9,28*10 ³	10 ⁴		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_3	6	9,09*10 ³	10 ⁴	8,46*10 ⁷	9,09*10 ⁷ ± 1,64*10 ⁷
		8,33*10 ³	10 ⁴		
		7,95*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_4	6	1,38*10 ⁴	10 ⁴	1,04*10 ⁸	
		7,95*10 ³	10 ⁴		
		9,28*10 ³	10 ⁴		
Klebstoff A_5	6	8,14*10 ³	10 ⁴	7,58*10 ⁷	
		6,63*10 ³	10 ⁴		
		7,95*10 ³	10 ⁴		

Tabelle 61: Belastungstest Hefen in Bodenbelagsklebstoffen

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_1	0	1,02*10 ⁴	10 ²	1,15*10 ⁶	
		1,23*10 ⁴	10 ²		
		1,19*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff A_2	0	1,38*10 ⁴	10 ²	1,41*10 ⁶	
		1,42*10 ⁴	10 ²		
		1,42*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff A_3	0	1,17*10 ⁴	10 ²	1,29*10 ⁶	1,32*10 ⁶ ± 1,31*10 ⁵
		1,24*10 ⁴	10 ²		
		1,46*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff A_4	0	1,50*10 ⁴	10 ²	1,48*10 ⁶	
		1,53*10 ⁴	10 ²		
		1,42*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff A_5	0	1,13*10 ⁴	10 ²	1,25*10 ⁶	
		1,31*10 ⁴	10 ²		
		1,31*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff B_1	0	1,16*10 ⁴	10 ²	1,28*10 ⁶	
		1,21*10 ⁴	10 ²		
		1,48*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff B_2	0	1,28*10 ⁴	10 ²	1,27*10 ⁶	
		1,39*10 ⁴	10 ²		
		1,13*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff B_3	0	1,24*10 ⁴	10 ²	1,33*10 ⁶	1,24*10 ⁶ ± 7,98*10 ⁴
		1,20*10 ⁴	10 ²		
		1,53*10 ⁴	10 ²		
Klebstoff B_4	0	1,13*10 ⁴	10 ²	1,14*10 ⁶	
		1,13*10 ⁴	10 ²		
		1,17*10 ⁴	10 ²		

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff B_5	0	1,31*10 ⁴ 1,09*10 ⁴ 1,09*10 ⁴	10 ² 10 ² 10 ²	1,17*10 ⁶	
Mischung 1_1	0	1,27*10 ⁴ 1,08*10 ⁴ 9,47*10 ³	10 ² 10 ² 10 ²	1,10*10 ⁶	
Mischung 1_2	0	1,00*10 ⁴ 8,14*10 ³ 6,25*10 ³	10 ² 10 ² 10 ²	8,14*10 ⁵	
Mischung 1_3	0	9,85*10 ³ 1,06*10 ⁴ 1,02*10 ⁴	10 ² 10 ² 10 ²	1,02*10 ⁶	1,07*10 ⁶ ± 2,22*10 ⁵
Mischung 1_4	0	5,11*10 ³	10 ²	1,70*10 ⁵	
Mischung 1_5	0	1,31*10 ⁴ 1,28*10 ⁴ 1,46*10 ⁴	10 ² 10 ² 10 ²	1,35*10 ⁶	
Klebstoff A_1	1	1,20*10 ² 1,00*10 ² 9,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	1,03*10 ⁴	
Klebstoff A_2	1	4,00*10 ¹ 7,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	5,00*10 ³	
Klebstoff A_3	1	1,30*10 ² 1,90*10 ² 1,70*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	1,63*10 ⁴	1,31*10 ⁴ ± 2,47*10 ³
Klebstoff A_4	1	1,20*10 ² 1,20*10 ² 1,40*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	1,27*10 ⁴	
Klebstoff A_5	1	1,30*10 ² 1,20*10 ² 1,40*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	1,30*10 ⁴	
Klebstoff A_1	2	3,19*10 ³ 3,58*10 ³ 3,31*10 ³	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	3,36*10 ⁴	
Klebstoff A_2	2	3,36*10 ³ 3,77*10 ³ 3,42*10 ³	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	3,52*10 ⁴	
Klebstoff A_3	2	2,28*10 ³ 2,10*10 ³ 2,15*10 ³	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	2,28*10 ⁴	3,52*10 ⁴ ± 1,65*10 ³

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_4	2	3,10*10 ³ 3,55*10 ³ 3,74*10 ³	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	3,46*10 ⁴	
Klebstoff A_5	2	3,70*10 ³ 3,80*10 ³ 3,75*10 ³	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	3,75*10 ⁴	
Klebstoff A_1	3	1,02*10 ³ 9,70*10 ² 8,80*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	9,57*10 ⁴	
Klebstoff A_2	3	7,00*10 ² 6,90*10 ² 8,70*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	7,53*10 ⁴	
Klebstoff A_3	3	1,01*10 ³ 1,04*10 ³ 9,80*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	1,01*10 ⁵	1,14*10 ⁵ ± 1,78*10 ⁴
Klebstoff A_4	3	1,03*10 ³ 1,36*10 ³ 1,47*10 ³	10 ² 10 ² 10 ²	1,29*10 ⁵	
Klebstoff A_5	3	1,22*10 ³ 1,38*10 ³ 1,26*10 ³	10 ² 10 ² 10 ²	1,29*10 ⁵	
Klebstoff A_1	6	8,20*10 ² 7,70*10 ² 6,30*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	7,40*10 ⁴	
Klebstoff A_2	6	8,80*10 ² 6,90*10 ² 7,10*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	7,60*10 ⁴	
Klebstoff A_3	6	6,50*10 ² 7,30*10 ² 5,90*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	6,57*10 ⁴	7,67*10 ⁴ ± 7,62*10 ³
Klebstoff A_4	6	7,30*10 ² 8,90*10 ² 9,20*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	8,47*10 ⁴	
Klebstoff A_5	6	7,00*10 ² 8,90*10 ² 9,00*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	8,30*10 ⁴	

Tabelle 62: Belastungstest Hefen in Bodenbelagsklebstoffen nach künstlicher Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_1	0	7,40*10 ² 7,20*10 ² 6,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,93*10 ⁵	
Klebstoff A_2	0	5,10*10 ² 6,30*10 ² 4,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,37*10 ⁵	
Klebstoff A_3	0	6,90*10 ² 5,70*10 ² 4,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,83*10 ⁵	6,03*10 ⁵ ± 6,38*10 ⁴
Klebstoff A_4	0	6,60*10 ² 5,30*10 ² 4,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,60*10 ⁵	
Klebstoff A_5	0	7,60*10 ² 5,30*10 ² 6,40*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,43*10 ⁵	
Klebstoff B_1	0	7,60*10 ² 7,10*10 ² 6,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,00*10 ⁵	
Klebstoff B_2	0	6,70*10 ² 8,10*10 ² 5,30*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,70*10 ⁵	
Klebstoff B_3	0	6,30*10 ² 8,10*10 ² 6,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,30*10 ⁵	6,78*10 ⁵ ± 3,70*10 ⁴
Klebstoff B_4	0	7,30*10 ² 6,90*10 ² 7,60*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	7,27*10 ⁵	
Klebstoff B_5	0	6,30*10 ² 6,50*10 ² 7,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	6,63*10 ⁵	
Mischung 1_1	0	4,90*10 ² 4,50*10 ² 5,20*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,87*10 ⁵	
Mischung 1_2	0	4,80*10 ² 5,20*10 ² 3,90*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,63*10 ⁵	
Mischung 1_3	0	4,60*10 ² 5,60*10 ² 5,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,10*10 ⁵	4,94*10 ⁵ ± 2,12*10 ⁴

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Mischung 1_4	0	6,40*10 ² 5,30*10 ² 3,10*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	4,93*10 ⁵	
Mischung 1_5	0	4,30*10 ² 5,50*10 ² 5,70*10 ²	10 ³ 10 ³ 10 ³	5,17*10 ⁵	
Klebstoff A_1	1	8,00*10 ¹ 1,00*10 ² 6,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	8,00*10 ³	
Klebstoff A_2	1	4,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 3,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	2,67*10 ³	
Klebstoff A_3	1	1,20*10 ² 1,10*10 ² 1,80*10 ²	10 ² 10 ² 10 ²	1,37*10 ⁴	1,87*10 ⁴ ± 3,80*10 ³
Klebstoff A_4	1	1,30*10 ² 8,00*10 ¹ 9,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	1,00*10 ⁴	
Klebstoff A_5	1	8,00*10 ¹ 1,60*10 ² 4,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	9,33*10 ³	
Klebstoff A_1	2	1,00*10 ¹ 1,00*10 ¹	10 ² 10 ²	6,67*10 ²	
Klebstoff A_2	2	3,00*10 ¹	10 ²	1,00*10 ³	
Klebstoff A_3	2	1,14*10 ³ 1,45*10 ³ 1,63*10 ³	10 ² 10 ² 10 ²	1,41*10 ⁵	1,34*10 ³ ± 6,26*10 ²
Klebstoff A_4	2	2,00*10 ¹ 1,00*10 ¹ 1,00*10 ¹	10 ² 10 ² 10 ²	1,33*10 ³	
Klebstoff A_5	2	1,40*10 ²	10 ²	4,67*10 ³	
Klebstoff A_1	3	1,20*10 ² 1,00*10 ² 1,00*10 ²	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	1,07*10 ³	
Klebstoff A_2	3	1,20*10 ² 1,20*10 ² 1,80*10 ²	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	1,40*10 ³	
Klebstoff A_3	3	2,10*10 ² 1,90*10 ² 1,10*10 ²	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	1,70*10 ³	1,62*10 ³ ± 4,53*10 ²

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungs-faktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Klebstoff A_4	3	2,90*10 ² 2,10*10 ² 1,90*10 ²	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	2,30*10 ³	
Klebstoff A_5	3	1,40*10 ² 1,50*10 ² 2,00*10 ²	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	1,63*10 ³	
Klebstoff A_1	6	3,00*10 ¹ 2,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	3,00*10 ²	
Klebstoff A_2	6	1,00*10 ¹ 1,20*10 ² 3,00*10 ¹	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	5,33*10 ²	
Klebstoff A_3	6	1,00*10 ¹ 2,00*10 ¹ 1,00*10 ¹	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	1,33*10 ²	3,55*10 ² ± 1,31*10 ²
Klebstoff A_4	6	3,00*10 ¹ 5,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	4,00*10 ²	
Klebstoff A_5	6	3,00*10 ¹ 4,00*10 ¹ 4,00*10 ¹	10 ¹ 10 ¹ 10 ¹	3,67*10 ²	

Rot markierte Zahlen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.